

Bedeutung von miRNAs bei der Entstehung und Progression des malignen Melanoms



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III -Biologie und Vorklinische Medizin-
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Daniel W. Müller
aus Straubing

April 2009

Promotionsgesuch eingereicht am 21. April 2009

Termin der mündlichen Prüfung: 24. Februar 2010

Die Arbeit wurde angeleitet von Frau Prof. Dr. Anja-Katrin Bosserhoff

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: *Prof. Dr. Reinhard Wirth*

1. Gutachter: *Prof. Dr. Ernst Tamm*

2. Gutachterin: *Prof. Dr. Anja-Katrin Bosserhoff*

3. Prüfer: *Prof. Dr. Gernot Längst*

„Der Mensch ist weder ein Irrtum der Natur, noch sorgt diese automatisch und selbstverständlich für seine Erhaltung. Der Mensch ist Teilnehmer an einem großen Spiel, dessen Ausgang für ihn offen ist.“

Prof. Dr. Manfred Eigen

*(Manfred Eigen, Ruthild Winkler:
DAS SPIEL - Naturgesetze steuern den Zufall; Piper-Verlag, 1975)*

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	
1. EINLEITUNG	1
1.1 Struktur und Aufbau der Haut	1
1.2 Das maligne Melanom	2
1.3 Inzidenz des malignen Melanoms	3
1.4 Klassifikation des malignen Melanoms	3
1.5 Pathogenese des malignen Melanoms	5
1.6 Prognose des malignen Melanoms	6
1.7 Molekulare Grundlagen der Entstehung und Progression des malignen Melanoms	8
1.8 Zelladhäsions-Moleküle	8
1.8.1 Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle: Die Cadherine	9
1.8.2 Zell-Matrix-Adhäsionsmoleküle: Die Integrine	12
1.9 Regulation der Adhäsion von Melanomzellen an die ECM: Das Protein MIA	16
1.10 Aufrechterhaltung der Zellpolarität: Das Protein Hugel-1 im malignen Melanom ..	19
1.11 Transkriptionsfaktoren	20
1.11.1 Die Familie der Homeobox-Transkriptionsfaktoren	22
1.12 Posttranskriptionelle Regulation der Genexpression durch miRNAs	24
1.12.1 miRNA Biogenese	26
1.12.2 Grundlagen der Interaktion zwischen miRNA und Ziel-mRNA	28
1.12.3 Mechanismen der miRNA vermittelten Inhibition der mRNA Expression ..	30
1.12.4 miRNAs im malignen Melanom – Stand der Forschung zu Beginn dieser Arbeit	36
2. ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT	39
3. ERGEBNISSE	40
3.1 Regulation der Integrin beta3 Expression durch die miRNA let-7a	40
3.2 Regulation der Expression des Homeobox-Gens <i>HOX-C8</i> durch die miRNA miR-196a	52
3.3 Identifikation im malignen Melanom fehlregulierter miRNAs durch Generierung der miRNA Expressionsprofile von Melanozyten und Melanomzelllinien	60

4. DISKUSSION	82
4.1 Die Rolle der miRNA let-7a im malignen Melanom und die allgemeine Bedeutung der let-7 miRNA-Familie in der Kanzerogenese	82
4.2 Regulation von HOX-C8 durch die miRNA miR-196a im malignen Melanom und die Bedeutung von HOX-Genen in der Tumorigenese	89
4.3 Detektion einer großen Anzahl im Melanom fehlregulierter miRNAs durch den Vergleich der miRNA-Expressionsprofile von Melanozyten und Melanomzellen	99
 5. MATERIALIEN UND METHODEN	 107
5.1 Materialien.....	107
5.2 Methoden	126
 EIGENE PUBLIKATIONEN.....	 143
LITERATURVERZEICHNIS	144
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	160
DANKSAGUNG	162
ERKLÄRUNG	163

Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Dissertation ist die Analyse der Bedeutung einer neuen Klasse kleiner, nicht-codierender RNAs, den microRNAs (miRNAs), bei der Entstehung und Progression des malignen Melanoms.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei miRNAs identifiziert werden, welche als wichtige Tumorsuppressoren im Melanom fungieren. Eine dieser miRNAs ist let-7a. Es konnte gezeigt werden, dass die Regulation der Expression von Integrin beta3 in Melanomzellen auf posttranskriptioneller Ebene durch diese miRNA erfolgt, während Promotor-abhängige Mechanismen nur eine untergeordnete Rolle spielen. Der Verlust von let-7a im Melanom führt zur Induktion der Integrin beta3 Expression und trägt dadurch wesentlich zum invasiven Potenzial von Melanomzellen bei. Das Einbringen synthetischer let-7a Moleküle führt zu einer starken Reduktion der Invasivität von Melanomzellen und könnte somit als neuartiger therapeutischer Ansatz verfolgt werden.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expression einer zweiten miRNA, miR-196a, im malignen Melanom stark vermindert vorliegt. Dies führt zu einem Anstieg des in normalen humanen Melanozyten durch miR-196a reprimierten Homeobox-Transkriptionsfaktors HOX-C8 in Melanomzellen. Durch die verstärkte Expression von HOX-C8 werden mindestens drei weitere, Tumor-relevante Gene, nämlich Osteopontin, Cadherin11 und Calponin-1, in Melanomzellen fehlreguliert. Durch die Reprimierung von HOX-C8 und dem daraus resultierenden indirekten Einfluss auf eine Vielzahl Tumor-assoziiierter Gene, kommt miR-196a im Melanom eine Rolle als potenter Tumorsuppressor zu. Dies konnte in preliminären Mausexperimenten, in welchen die Re-Expression von miR-196a in Melanomzellen die Tumorbildung *in vivo* signifikant verzögerte, bestätigt werden.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurden miRNA-Expressionsprofile von normalen humanen Melanozyten und etablierten Melanomzelllinien generiert. Durch Abgleichen der miRNA-Expressionsprofile und unter zusätzlicher Verwendung von *in vitro* Melanom-Modellsystemen, konnte eine große Anzahl miRNAs identifiziert werden, deren Fehlexpression mit verschiedenen Schritten der Melanomprogression assoziiert ist. Interessanterweise wurde dabei der überwiegende Teil deregulierter miRNAs in Melanomzellen verstärkt exprimiert. Der Großteil der identifizierten miRNAs wurde bisher nicht in Verbindung mit Prozessen der Tumorentstehung oder -progression im Allgemeinen und der Tumorigenese des malignen Melanoms im Speziellen diskutiert. Weitere, funktionelle Analysen dieser miRNAs könnten neue Einsichten in die Mechanismen der Entstehung und Progression des malignen Melanoms ermöglichen.

1. Einleitung

1.1 Struktur und Aufbau der Haut

Die Haut stellt das größte Organ des Körpers dar und ist sehr komplex strukturiert. Abbildung 1-1 zeigt eine schematische Darstellung des Aufbaus der Haut. Dabei trennt die Basalmembran die epitheliale Epidermis von der bindegewebigen Dermis, welche an das subkutane Fettgewebe zwischen der Haut und den tiefer liegenden Strukturen angrenzt.

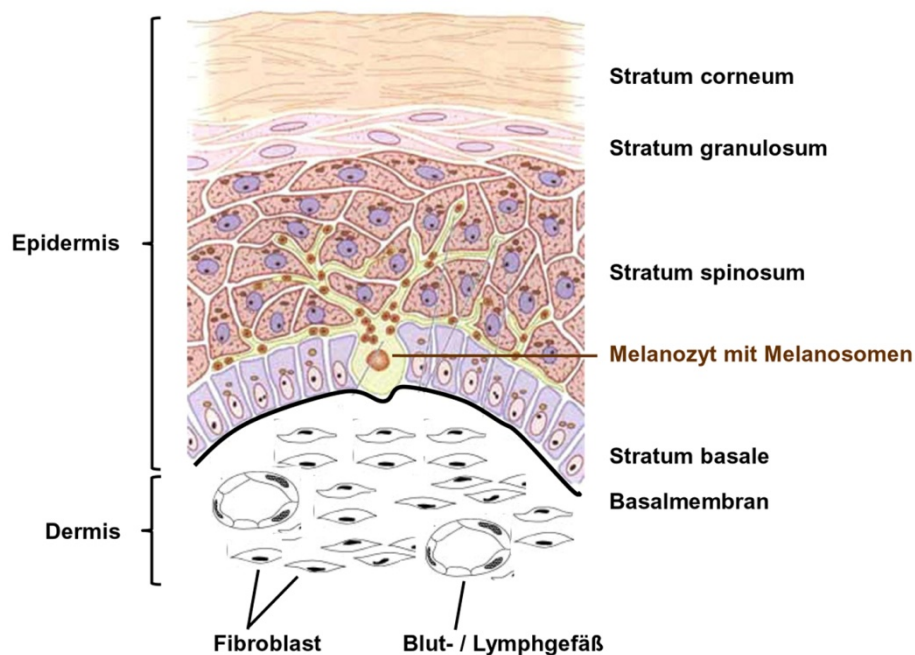


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung des Aufbaus der Haut (Quelle: www.ccs.k12.in.us und Hsu et al. 2002; modifiziert).

Die Dermis besteht hauptsächlich aus dicken Bündeln von Kollagenfasern, in welche Nerven, Blut- und Lymphgefäße, sowie Schweißdrüsen und Haarfollikel eingelagert sind. Auch die Epidermis wird von ihr über die Kapillaren der Papillen durch Diffusion mit Nährstoffen versorgt.

Die der Dermis aufgelagerte Basalmembran setzt sich aus Lamina fibroreticularis (ein dichtes Netzwerk retikulärer kollagener Fasern) und Basallamina zusammen. Beide Bestandteile der Basallamina, Lamina densa und Lamina rara, sind jeweils ca. 20nm dick und bestehen hauptsächlich aus Typ IV Kollagen, Laminin sowie unterschiedlichen Proteoglykanen. Die Basallamina hat Einfluss auf Zellmetabolismus, Zellpolarität und Zelldifferenzierung, wobei sie weiterhin auch ein Leitelement für Zellmigrationen ist.

Als äußerste Schicht der Haut ist die Epidermis frei von Nerven oder Blutgefäßen, dient als Schutz vor Umwelteinflüssen und ist an der Regulation des Flüssigkeitshaushaltes des Körpers beteiligt. Sie besteht aus mehreren Zellschichten, nämlich Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum (von innen nach außen). Die Epidermis enthält eine Vielzahl spezialisierter Zellen, darunter hauptsächlich Keratinozyten, die in der tiefsten epidermalen Schicht, dem Stratum basale, als hochprismatische Basalzellen vorliegen. Die Tochterzellen dieser Basalzellen wandern im Laufe der Zeit in Richtung Oberfläche und bilden dabei zunächst das Stratum spinosum. Hier liegen sie als polygonale Zellen mit kurzen, stachelartigen Fortsätzen vor. Die älteren Zellen des darüber liegenden Stratum granulosum, enthalten im Zytoplasma die namensgebenden Keratingranula. Keratin ist für die Rigidität und die Elastizität der Haut verantwortlich. Im Stratum corneum, der äußersten Schicht der Epidermis, findet sich letztlich eine breite Lage abgestorbener Zellen, in welchen das gesamte Zytoplasma sowie der Nukleus durch Keratin ersetzt wurde.

Neben den Keratinozyten sind die im Stratum basale lokalisierten Melanozyten ein weiterer wichtiger Bestandteil der Epidermis. Diese dendritischen Zellen stammen nicht von den Basalzellen ab, sondern sind neuroektodermaler Herkunft. Dabei wandern ihre Vorläuferzellen, die Melanoblasten, während der Embryogenese aus der Neuralleiste in die entstehende Haut ein. Sie liegen der Basallamina direkt auf und sind über Hemidesmosomen mit ihr verbunden. Jeder Melanozyt bildet mit ca. 35 Keratinozyten eine epidermale Melanozyteneinheit. Im Rahmen dieser Einheit gibt er das von ihm aus der Aminosäure Tyrosin synthetisierte Pigment Melanin, welches in Melanosomen genannten Vesikeln transportiert wird, über seine dendritischen Zellausläufer an die Keratinozyten ab. Diese speichern es zum Schutz der DNA gegen schädliche UV-Strahlung in ihrem eigenen Zytoplasma. Unter normalen physiologischen Umständen liegen die Melanozyten in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:8 zu den Keratinozyten vor (Li und Herlyn, 2000), wobei letztere das Wachstum und die Proliferation der Melanozyten kontrollieren (Hsu et al. 2002).

1.2 Das maligne Melanom

Das maligne Melanom (schwarzer Hautkrebs) ist ein bösartiger invasiv wachsender Tumor, dessen Ursache in 90% aller Fälle in der geschwulstartigen Entartung von Melanozyten liegt und der sich überwiegend in der Haut manifestiert. In selteneren Fällen entstehen Melanome aus Pigmentzellen des Auges (Uvea und Retina), sowie der Schleimhäute und der Hirnhäute verschiedener Lokalisation. Beim malignen Melanom handelt es sich um einen hochmalignen Tumor, der, im Gegensatz zum Basalzellkarzinom, schon bei geringem

Tumorzahlen zur Metastasierung neigen und dadurch eine ungünstige Prognose zur Folge hat (Hein et al. 2000; Altmeyer und Bacharach-Buhles 2007).

1.3 Inzidenz des malignen Melanoms

Laut WHO (World Health Organisation) steigt die Zahl der Melanom-Fälle weltweit schneller als die jeder anderen Art von malignen Tumoren (Parkin et al., 2001). Es wird geschätzt, dass sich die Inzidenzrate des malignen Melanoms alle 10 bis 20 Jahre verdoppelt (Garbe et al. 2000). Dabei sind die hellhäutigen kaukasischen Bevölkerungsgruppen am stärksten betroffen, was dem Grad der Pigmentierung der Haut eine entscheidende Bedeutung bei der Melanomentstehung zuweist. Dafür spricht auch das in Europa zu beobachtende, deutliche Nord-Süd Gefälle der Inzidenzrate. Während in den skandinavischen Ländern im Norden Europas 15 pro 100.000 Einwohner ein Melanom entwickeln, sind in den mediterranen Regionen im Süden Europas die Raten wesentlich geringer (ca. 5 bis 7 pro 100.000 Einwohner; Garbe 2001). Desweiteren zeigt dies, dass eine kumulative UV-Belastung nicht zwingend zu einer erhöhten Melanominzidenz führen muss (Bertz et al. 2006).

In Deutschland wird jedes Jahr bei 6.000 Männern und 7.700 Frauen ein malignes Melanom diagnostiziert. Das mittlere Erkrankungsalter fällt dabei mit 56 Jahren deutlich geringer aus als bei anderen Krebserkrankungen. Für Krebs insgesamt liegt es bei 65,5 Jahren für Männer und über 67 Jahren bei Frauen.

Für 2002 schätzte die WHO die Zahl der Neuerkrankungen am malignen Melanom auf 160.000 Fälle, die Anzahl der Melanom Todesfälle auf 41.000 weltweit. Obwohl das Melanom damit nur 4% aller Hautkrebserkrankungen ausmacht, zeichnet es für 74% aller durch Hautkrebs verursachten Todesfälle verantwortlich. Der Grund hierfür liegt in einer frühen Metastasierung des Primärtumors und dem nahezu kompletten Fehlen effizienter Therapieansätze für Melanome in fortgeschrittenem Stadium. So ist die bis dato einzig wirksame Therapie die chirurgische Entfernung des Primärtumors *in toto* möglichst unmittelbar nach der Diagnose eines Melanoms.

1.4 Klassifikation des malignen Melanoms

Klinisch und histopathologisch lassen sich vier verschiedene Melanomtypen voneinander unterscheiden (Panizzon et al., 1999): superfiziell spreitendes Melanom (SSM), noduläres Melanom (NM), lentigo-maligna Melanom (LMM) und akral-lentiginöses Melanom (ALM). Einige Typen (ca. 5%) sind jedoch nicht klassifizierbar oder repräsentieren Mischformen.

Das **superfiziell spreitende Melanom** stellt mit annähernd 60 Prozent aller Fälle die häufigste Form des Melanoms dar und ist hauptsächlich an Rumpf und Extremitäten zu finden (Altmeyer und Bacharach-Buhles 2007; Hengge und Dummer 2006; Hein et al. 2000). Es tritt als bis zu 5cm große, von der gesunden Haut scharf abgegrenzte, flache Läsionen von grauer über rötliche bis hin zu brauner und schwarzer Farbe auf. In der Frühphase zeigt das SSM langsam voranschreitendes, horizontales Wachstum in der Epidermis (*melanoma in situ*). In späteren Stadien erfolgt ein Durchbruch durch die Basalmembran begleitet von vertikalem, invasiven Wachstum. Wird das SSM noch in der horizontalen Wachstumsphase und bei geringer Tumordicke diagnostiziert, besteht eine gute Prognose (Altmeyer und Bacharach-Buhles 2007; www.melanom.net/ssm.html).

Das **primär noduläre (knotige) Melanom** tritt in etwa 20% aller Melanomfälle auf und entsteht meist aus einem Muttermal vom Typ Nävuszellnävus. Dabei bilden sich braune, schwarze bis blauschwarze, glatte halbkugelige zum Teil auch unregelmäßige Knoten. Meist fehlt die radiale Wachstumsphase in der Progression des NM, wobei es zudem bereits in sehr frühen Stadien vertikales, invasives Wachstum zeigt. Dies hat eine ungünstige Prognose für das NM zur Folge (Altmeyer und Bacharach-Buhles 2007; www.melanom.net/nm.html; www.melresproj.com/clinic/pnm).

Das **lentigo maligna Melanom** wird in ca. 10% der Melanomfälle diagnostiziert. LMM treten meist bei älteren Menschen und vor allem an Stellen, welche dauerhaft lichtexponiert sind, z.B. dem Gesichts- und Kopfbereich, auf. Dabei entsteht das LMM aus einer zunächst gutartigen Vorläuferläsion, der „lentigo maligna“ (*Melanosis circumscripta praecancerosa* Dubreuilh), die durch chronische Lichtschädigung entsteht und im Vorfeld über lange Jahre unverändert bleiben kann. LMM manifestieren sich als meist unregelmäßig geformte, braune bis schwarze Male mit knotigen Bereichen, die sich in Farbe und Struktur von der lentigo maligna abgrenzen. Die Prognose ist bei diesem Melanomtyp günstiger als bei anderen, da erst spät ein vertikales, invasives Wachstum auftritt (Hein et al. 2000; Altmeyer und Bacharach-Buhles 2007; www.melanom.net/lmm.html).

Das **akral-lentiginöse Melanom** ist für 4-5% der Melanomfälle verantwortlich und entwickelt sich primär auf Handinnenflächen, Fußsohlen bzw. unter Finger- und Fußnägeln (*periungual* bzw. *subungual*), sowie auf Schleimhäuten unterschiedlicher Lokalisation. Dieser Melanomtyp tritt überdurchschnittlich häufig in dunkelhäutigen Populationen auf. Das ALM ist, ähnlich dem SSM, gekennzeichnet durch braune bis schwarze unregelmäßige Hautläsionen, die primär radiales, horizontales Wachstum aufweisen, welches in einem späteren Stadium in eine invasive, vertikale Wachstumsphase übergeht (Hengge und Dummer 2006; Altmeyer und Bacharach-Buhles 2007; www.melanom.net/alm.html).

Neben diesen vier Haupttypen existieren noch weitere, zum Teil extrem seltene Formen des Melanoms, wie das amelanotische, das okkulte und das okuläre Melanom, sowie die Schleimhautmelanome.

1.5 Pathogenese des malignen Melanoms

Die Tumorigenese des malignen Melanoms wird aufgrund histopathologischer Merkmale und in Anlehnung an ein von Clark et al. postuliertes Modell in 5 unterschiedliche Phasen gegliedert (siehe Abbildung 1-2), welche sich sowohl durch genetische, als auch durch morphologische Veränderungen auszeichnen (Clark, 1991; Clark et al., 1984; Meier et al., 1998):

(1) Als erste Stufe des Modells wird der gewöhnliche, angeborene oder erworbene **melanozytäre Nävus** angesehen. Es handelt es sich hierbei um benigne Neoplasien, welche durch die Proliferation von Melanozyten entstehen. Im Vergleich zu Personen, welche relativ wenige (0-15) gewöhnliche Nävi tragen, sind Individuen mit einer großen Anzahl (100-120) dieser Male einem siebenfach höheren Risiko an einem malignen Melanom zu erkranken, ausgesetzt. Dabei muss diese benigne Hautveränderungen jedoch nicht zwangsläufig in ein malignes Stadium übergehen. Für kongenitale Nävi mit einer Größe von über 20mm wird die Wahrscheinlichkeit, im Verlauf des Lebens in ein malignes Melanom überzugehen, mit etwa 5% angegeben.

(2) Dagegen gelten **dysplastische** (atypische) **Nävi** als Vorläuferläsionen und als Risikofaktoren des malignen Melanoms: fünf dysplastische Nävi erhöhen das Melanomrisiko um das Sechsfache im Vergleich zu Personen, welche frei von atypischen Nävi sind. Die dysplastischen Nävi zeigen eine epithelartige Struktur mit unregelmäßig angeordneten Nestern von Melanozyten als zytologische Atypien.

(3) Im ersten malignen Stadium der Melanomentwicklung und Progression, der frühen, **radialen Wachstumsphase** (radial growth phase, RGP), breiten sich die Zellen des Primärmelanoms horizontal in der Epidermis aus. Sie zeichnen sich dabei durch eine kaum ausgeprägte Differenzierung und durch geringe lokale Invasivität und Proliferation aus.

(4) In der anschließenden **vertikalen Wachstumsphase** (vertical growth phase, VGP) durchdringen die Melanomzellen die Basalmembran, infiltrieren die Dermis und besitzen die Fähigkeit zu invasivem, metastatischem Wachstum.

(5) Als letzte Stufe dieses Progressionsmodells gilt das **metastasierende Melanom**, welches sich sowohl über das Blut- als auch über das Lymphgefäßsystem im gesamten Körper ausbreiten kann.

Nicht zwangsläufig muss die Entstehung und Progression eines Melanoms alle fünf Stufen dieses Modells abdecken, einzelne Stufen können oftmals übersprungen werden. Dabei wurde auch die Möglichkeit der „direkten Melanomentstehung“, durch die maligne Transformation von normalen Melanozyten, beschrieben (Miller und Mihm, Jr. 2006; Altmeyer und Bacharach-Buhles 2007; Xu und Koo 2006; Hsu et al. 2002; Clark, Jr. et al. 1984).

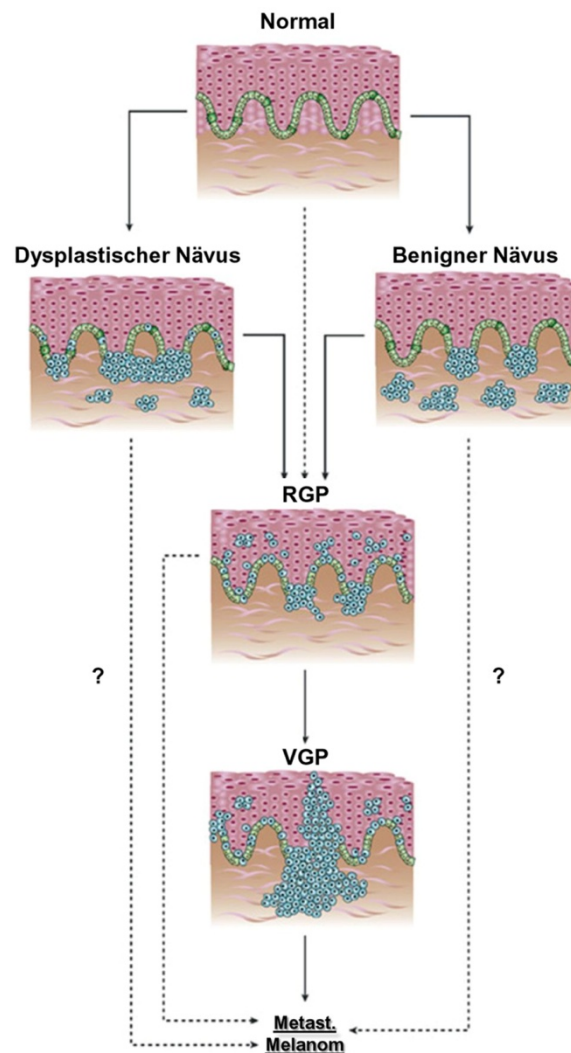


Abbildung 1-2: Modell der Melanomentstehung und -progression (nach Chin 2003, modifiziert). RGP: radial growth phase; VGP: vertical growth phase; Metast. Melanom: metastatisches Melanom.

1.6 Prognose des malignen Melanoms

Die wichtigsten Kriterien für die Prognose des Patienten sind die Dicke des Primärtumors (Einteilung der Tumordicke nach Breslow), die Eindringtiefe des Tumors (Einteilung nach

Clark-Level), der metastatische Befall der Lymphknoten und das Vorliegen von Fernmetastasen (Volkenandt et al. 2000).

Die Tumordicke nach Breslow wird an histologischen Präparaten bestimmt, wobei vom Stratum granulosum bis zur tiefst gelegenen Tumorzelle gemessen wird (zur Übersicht über die Schichten der Haut siehe Punkt 1.1) (Sander et al. 2000). Eine Tumordicke des Primärtumors $\leq 0,75\text{mm}$ geht mit einer guten Prognose einher, die 10-Jahres-Überlebensrate liegt hier bei 97%. Mit zunehmendem Breslow-Index ($<1,5\text{mm}$; $<4,0\text{mm}$; $>4,0\text{mm}$) sinkt die 10-Jahres-Überlebensrate jedoch auf bis zu 43% ab (Orfanos et al. 1994). Im Jahr 2001 wurde durch das American Joint Committee on Cancer (AJCC) eine neue Klassifikation und Stadieneinteilung für das maligne Melanom publiziert, durch welche sich die Werte für die Tumordicke nach Breslow leicht geändert haben.

Mit dem Auftreten von lokoregionalen Lymphknotenmetastasen bzw. Fernmetastasen fällt die 10-Jahres-Überlebensrate drastisch auf 30% bzw. 5% ab. Eine kurative Behandlung durch operatives Entfernen des Melanoms ist nur im frühen Stadium des Primärtumors möglich. Durch fortwährende Bemühungen zur besseren Aufklärung der Bevölkerung sowie zur Sensibilisierung der Ärzteschaft konnte eine sehr frühe Identifikation von Melanom-Läsionen erzielt werden. Durch das schnelle Entfernen der Läsion in den frühesten Stadien der Melanomkrankung konnten die aktuell stagnierenden Mortalitätsraten des malignen Melanoms erreicht werden.

Dennoch bleiben (wie oben zu sehen) die Überlebensraten für in ihrem vertikalen Wachstum fortgeschrittene Tumoren niedrig, wobei letztere sich zusätzlich als sehr resistent gegenüber konventionellen Chemo- oder Radiotherapien erweisen. Vor allem die Heilungsaussichten nach Metastasierung in die Lymphknoten und nach Bildung von Fernmetastasen sind sehr gering. Weiterhin kommt es trotz operativen Entfernens des Melanoms in frühen Stadien dennoch häufig zur Metastasierung des Tumors.

Das maligne Melanom bleibt somit vor dem Hintergrund stetig steigender Inzidenzraten, sowie des Fehlens wirksamer Therapien für fortgeschrittene Stadien dieser Erkrankung, eine ernstzunehmende Bedrohung für die Gesundheit jedes einzelnen. Aus diesen Gründen ist die Entwicklung neuer Therapieansätze notwendig. Dabei ist es Aufgabe der Grundlagenforschung, die molekularen Mechanismen, welche der Tumorigenese des malignen Melanoms zugrunde liegen, zu entschlüsseln und somit Angriffspunkte für neue Therapien bereitzustellen.

1.7 Molekulare Grundlagen der Entstehung und Progression des malignen Melanoms

Die Ursachen der Melanomentstehung bleiben trotz intensiver Forschung bis dato ungeklärt. Allerdings konnte eine Kausalität zwischen Melanomentstehung und der Sonnenbelastung der Haut aufgezeigt werden. Häufige Intervalle intensiver Sonnenexposition und wiederholte Sonnenbrände, vor allem im Kindesalter, sind Auslöser der Melanomentstehung. Dabei wird der übermäßigen Einwirkung der ultravioletten Strahlung des Sonnenlichtes (vor allem des UV-B Anteils) auf die Haut eine direkte mutagene Wirkung auf die DNA der Zellen zugesprochen (Perlman und Herlyn 2004). Zudem erzeugt sie oxidierte Formen des Melanins, welche die DNA zusätzlich schädigen und die Apoptose der Zellen unterdrücken können (Meyskens et al. 2004). Im Falle der Melanozyten können Mutationen in der DNA zu deren Transformation in Melanomzellen führen. Dabei entziehen sie sich der Kontrolle durch die Keratinozyten und werden autonom. Dies beinhaltet eine Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, sowie die Fähigkeit, sich Apoptosesignalen zu entziehen. Auf diese Weise kann der Tumor ungehemmt proliferieren. Zudem erwerben Melanomzellen durch ein verändertes Motilitäts- und Adhäsionsverhalten die Fähigkeit, aus der Epidermis auszuwandern, die Basalmembran zu durchdringen und sich durch Invasion der Blut- und Lymphgefäßsysteme im Körper ausbreiten zu können (Satyamoorthy et al. 2002).

Generell können die multiplen Gendefekte, welche normale Zellen bei ihrer Entartung zu Tumorzellen akquirieren, zum einen zu einer Inaktivierung von Tumor-unterdrückenden Genen (Tumorsuppressor-Genen) und zum anderen zu einer Aktivierung von Tumorfördernden Genen (Onkogenen) führen. Diese Onkogene bzw. Tumorsuppressor-Gene sind an der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse wie Proliferation, Zellzyklus, Zellpolarität, Apoptose und Motilität der Zellen beteiligt. Im Folgenden werden einige Melanom-relevante Onkogene und Tumorsuppressor-Gene, sowie die Signalwege, an welchen sie partizipieren, erörtert. Dabei wird sich auf für die vorliegende Arbeit relevanten Moleküle und Signalwege beschränkt.

1.8 Zelladhäsions-Moleküle

Eine wichtige Aufgabe epithelialer Zellverbände ist die Abgrenzung von Organen und Geweben gegen deren äußere Umgebung. Die Haut nimmt dabei eine besondere Stellung ein, da sie den Organismus als Ganzes gegenüber seiner Umwelt abgrenzt. Die geordnete Struktur epithelialer Gewebe basiert zum einen auf sehr engen Kontaktstellen zwischen zwei Epithelzellen unter Aneinanderlagerung der Doppelmembranen beider Zellen und zum

anderen auf adhärenenten Verbindungen, die sich zwischen zwei Epithelzellen oder einer Epithelzelle und der umgebenden extrazellulären Matrix ausbilden. Dabei stellen adhärenente Oberflächenmoleküle einen Kontakt zwischen den, die Zelle durchspannenden Aktinfilamenten und der spezifischen Oberfläche oder der Membran einer anderen Zelle her. Zelladhäsionsmoleküle haben weitreichende Auswirkungen, so wird die Gewebs- und Organarchitektur multizellulärer Organismen durch sie festgelegt. Weiterhin reguliert sie die dynamischen Prozesse der Morphogenese im Verlauf der Embryonalentwicklung, der Regeneration von Organen und den generellen Ablauf des Zellverhaltens (Wagener et al. 1999). Im Folgenden sollen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsionsmoleküle charakterisiert werden, welche bei der Transformation von normalen Melanozyten zu Melanomzellen eine wichtige Rolle spielen.

1.8.1 Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle: Die Cadherine

Die menschliche Epidermis stellt eine hoch geordnete Struktur dar. Grundlage dafür ist die spezifische Adhäsion zwischen Keratinozyten, und zwischen Keratinozyten und Melanozyten. Diese beruht auf verschiedenen Membranmolekülen.

Eine wesentliche Rolle kommt dabei der Superfamilie der Cadherine zu. Sie wird in fünf Unterfamilien gruppiert: (1) Die klassischen Cadherine (Typ 1), die in adhärenenten Verbindungen lokalisiert sind (E-, N-, P- und R-Cadherine). (2) Dieser Gruppe sehr ähnlich sind die klassischen Cadherine des Typs 2 (VE-, K- und H-Cadherine). (3) Die desmosomalen Cadherine formen desmosomale Verbindungen (u.a. Desmocollin und Desmoglein). (4) Die Cadherine mit einer eher kurzen, bzw. völlig ohne, cytoplasmatische Domäne (LI-, T-Cadherin). (5) Die Protocadherine sind vor allen Dingen an der Entwicklung des Nervensystems beteiligt. (6) Desweiteren existieren Cadherin-verwandte Proteine, welche über eine Sieben-Transmembran-Domäne verfügen (z.B. Flamingo). Zusätzlich gibt es Cadherine, die keiner Unterfamilie exakt zugeordnet werden können, wie Fat und Dachsous (Nollet et al. 2000; Peinado et al. 2004). Generell ist die Struktur der Mitglieder der Cadherin-Superfamilie hoch konserviert, lediglich die Anzahl der Cadherindomänen im extrazellulären Teil variiert bei den Unterfamilien (Takeichi 1995).

1.8.1.1 Deregulation der E-Cadherin Expression in der Melanomentstehung

Wie in Punkt 1.1 detailliert beschrieben, sind die Melanozyten in der Epidermis auf der Basalmembran verankert und werden von den Keratinozyten umgeben. Dabei üben die

Keratinocyten Einfluss auf die Proliferation und Lokalisation der Melanozyten, sowie auf die Anzahl der von diesen ausgebildeten Dendriten aus (Hsu et al. 2000a; Hsu et al. 2000b). Für die „Kommunikation“ zwischen den Melanozyten und Keratinocyten ist das Zelladhäsions-Molekül E-Cadherin (Uvomorulin, epitheliales Cadherin) verantwortlich, welches als epithelialer Marker normaler Melanozyten gilt. Dabei kommt es zu einer homophilen Interaktion zweier auf unterschiedlichen Zellen lokalisierter E-Cadherin Moleküle.

E-Cadherin ist ein 120 kDa transmembranes Glykoprotein, dessen extrazelluläre Domäne sich aus fünf homologen Einheiten (EC1-EC5) von jeweils 110 Aminosäuren zusammensetzt. Die N-terminale Einheit EC1 spielt eine Schlüsselrolle bei der homophilen Interaktion von zwei Cadherin Molekülen. Die Interaktion der extrazellulären Domänen der aggregierenden Cadherin Moleküle wird durch Kalzium vermittelt, wodurch die Konformation des Moleküls und die Zelladhäsion stabilisiert werden.

Der intrazelluläre Teil der Cadherine ist über Catenine mit dem Aktinzytoskelett verbunden. Beta-Catenin bindet direkt an den zytoplasmatischen Teil von E-Cadherin. Alpha-Catenin stellt schließlich über beta-Catenin die Verbindung von E-Cadherin zum Zytoskelett her. Weitere zytoplasmatische Proteine, die an Cadherine binden, sind Tyrosinphosphatasen sowie p120, welches regulatorische Funktionen besitzt (Reynolds et al. 1994; Shibamoto et al. 1995; Staddon et al. 1995).

Immunhistochemische Studien zeigen eine, im Melanomgewebe im Vergleich zu Melanozyten und benignen Nävi signifikant verminderte bzw. vollständig verlorene E-Cadherin Expression (Sanders et al. 1999; Silye et al. 1998). Der Verlust der E-Cadherin Expression verursacht einen Verlust des regulierenden Einflusses der Keratinocyten, was zu unkontrollierter Proliferation der veränderten Melanozyten führt (Hsu et al. 1996; Poser et al. 2001; Silye et al. 1998).

Einhergehend mit dem Verlust von E-Cadherin kommt es im Rahmen der Melanomentwicklung zur Induktion der Expression von N-Cadherin. Die Expression von N-Cadherin verleiht den Melanomzellen die Fähigkeit, an die Fibroblasten des Stromas, sowie an Endothelzellen und weitere Zelltypen der Dermis zu binden, da diese ebenfalls N-Cadherin an ihrer Zelloberfläche exponieren (Li et al. 2001). Zudem sorgt N-Cadherin auch für die Aktivierung von antiapoptotischen Signalen (Sanders et al. 1999).

Durch diesen „switch“ von der E-Cadherin hin zur N-Cadherin Expression befinden sich die Melanomzellen in einem destabilisierten Zell-Verband und werden sowohl mobiler als auch invasiver, wodurch sie sich vom Primärtumor lösen können. Der Verlust der geordneten Gewebestruktur durch die Dysregulation von Zelladhäsionsmolekülen, welcher zu einem Lösen einzelner Zellen aus dem Gewebeverband führt, ist auch aus anderen Tumorarten

bekannt und wird als epitheliale mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet (Behrens 1999; Handschuh et al. 1999).

1.8.1.2 Snail als Repressor der E-Cadherin Expression

Das erste Mitglied der Superfamilie der Snail-Transkriptionsfaktoren wurde 1987 in *Drosophila melanogaster* isoliert, wo ihm eine Rolle in der Bildung des Mesoderms zukommt. Diverse Snail-Homologe wurden in Nematoden, Anneliden, Mollusken, Amphibien, sowie in Maus, Huhn und auch Menschen gefunden. Es handelt sich dabei um z.B. Slug, Scratch, Smug, Escargot, Worniu und Ces1. Sie alle gehören zu den Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren und verfügen in ihrem konservierten C-Terminus über 4-6 Wiederholungen eines Zinkfinger-motives. Snail Transkriptionsfaktoren erkennen die im Promotor ihrer Zielgene vorhandene E-Box, eine DNA-Bindungsstelle, welche aus den sechs Basenpaaren 5'-CANNTG-3' besteht (Nieto 2002). Neben der Beteiligung von Snail an der Mesodermbildung, liegt auch eine Beteiligung dieses Transkriptionsfaktors an der Entwicklung der Neuralleiste, dem Ursprungsort der Melanozyten-Progenitoren, vor.

Auch der Promotorbereich des *E-Cadherin* Gens enthält nahe am Transkriptionsstart zwei E-Box Elemente. Es konnte gezeigt werden, dass im malignen Melanom (wie auch in anderen Tumorarten) Snail an diese Sequenzen bindet und die Expression des Zell-Zell-Adhäsionsmoleküls reprimiert (Poser et al. 2001; Kuphal et al. 2004; Kuphal et al. 2005). Dementsprechend weisen Melanomzelllinien eine erhöhte Snail-Expression im Vergleich zu normalen Melanozyten auf. Diese erhöhte Snail-Expression ist direkt für den Verlust der E-Cadherin Expression verantwortlich, wie durch die Verwendung von sense- und antisense-Snail-Expressionsplasmiden gezeigt werden konnte. Außerdem zeigen Melanomzellen, in welchen die Snail-Expression durch Transfektion eines antisense-Plasmides unterbunden wurde (antisense-Snail Klon, as-Snail Klon), Veränderungen in der Expression einer Vielzahl von an der EMT beteiligten Genen (verminderte Expression von MMP-2, EMMPRIN, SPARC, TIMP-1, t-PA, RhoA, Notch4 und N-Cadherin, sowie eine Re-Expression von E-Cadherin). Diese Veränderungen beruhen allein auf dem Knockdown von Snail, nicht auf der re-induzierten E-Cadherin Expression (Kuphal et al. 2005).

Im Rahmen dieser und anderer Versuche konnte die Induktion der Snail-Expression in Melanomzellen als sehr frühes Ereignis in der Melanomentstehung identifiziert werden. Vermutlich ist sie zusammen mit dem resultierenden Verlust der E-Cadherin Expression verantwortlich für eine zumindest teilweise Umkehrung der in der Embryonalentwicklung stattfindenden Differenzierung der Epithelzellen. Es wurde bereits gezeigt, dass dieser als epithelial-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnete Mechanismus für die erhöhte

Motilität und Invasivität von Tumorzellen verantwortlich sein kann (Zhou et al. 2004). Die Melanomzellen können also durch den Snail-vermittelten Verlust der E-Cadherin Expression, wie oben beschrieben, aus dem Zellverband mit den Keratinozyten ausbrechen, wobei durch die Regulation weiterer Snail-Zielgene ein eher mesenchymaler, invasiver Phänotyp hervorgerufen wird. Der Verlust von E-Cadherin führt zudem zur Translokation von beta-Catenin in den Zellkern, wodurch letztlich eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFkappaB erfolgen kann. NFkappaB nimmt wie in 1.11 detailliert beschrieben durch die Regulation diverser Progressions-assoziiierter Gene wesentlichen Einfluss auf die Tumorigenese von Melanomzellen, wobei es sich u.a. auch auf den LEF/TCF-Signalweg und die Zellpolarität auswirkt. Die transformierten Melanozyten entwickeln sich somit von einem epithelialen hin zu einem mesenchymalen Phänotyp, was sie hoch-motil und invasiv macht. Im Rahmen der Experimente, die zur Aufklärung der Rolle von Snail im malignen Melanom führten, wurden Melanomzellen stabil mit einem antisense-Snail Plasmid transfiziert. In diesen Zellen kann eine Revertierung der Snail-vermittelten Effekte beobachtet werden, wodurch sie sich in ihrem Phänotyp wieder Epithelzellen annähern. Da die Induktion der Snail-Expression und der damit einhergehende Verlust von E-Cadherin als initiale Mechanismen in der Transformation von Melanozyten gelten, finden die antisense-Snail (as-Snail) Klone in unserer Arbeitsgruppe Anwendung als Modellsystem für frühe Ereignisse der Melanomentstehung.

1.8.2 Zell-Matrix-Adhäsionsmoleküle: Die Integrine

Die wichtigsten Zellmembranrezeptoren an adhärenen Kontaktstellen zwischen Epithelzellen und der extrazellulären Matrix (extra cellular matrix; ECM) sind die Integrine. Integrine sind heterodimere Transmembranrezeptoren aus einer alpha- und einer beta-Untereinheit, welche nicht kovalent miteinander assoziiert sind. Bisher konnten 18 unterschiedliche alpha- und 8 unterschiedliche beta-Untereinheiten identifiziert werden, welche zu 25 verschiedenen Integrinrezeptor-Typen zusammengesetzt sein können (Seftor et al. 1999). Auf Basis der Untereinheiten, aus welchen sie zusammengesetzt sind, sowie ihrer Ligandenspezifität werden Integrinrezeptoren in vier Unterfamilien eingeteilt. Die **beta1-Unterfamilie** umfasst die größte Anzahl an Mitgliedern, da 12 verschiedene alpha Untereinheiten mit der beta1 Untereinheit interagieren können. Integrine dieser Unterfamilie stellen hauptsächlich den Kontakt von Zellen mit der ECM her. Die Integrine der **beta2- / beta7-Unterfamilie** sind Leukozyten-spezifische Rezeptoren und vermitteln die Interaktion mit interzellulären Adhäsionsmolekülen (ICAMs), E-Cadherin und Fibrinogen. Der **alphaV-Unterfamilie** kommt eine wichtige Bedeutung in der Organogenese von Säugetieren zu. Die

Integrine dieser Unterfamilie werden sowohl von Epithelzellen, Endothelzellen und Osteoklasten als auch von verschiedenen Tumorzellen exprimiert (van der Flier und Sonnenberg 2001). Die **beta3-Unterfamilie** ist mit histopathologischen Merkmalen wie der erhöhten Tumorigenität von entarteten Melanozyten assoziiert und dient als molekularer Tumormarker. Auf den im Melanom wichtigsten Vertreter dieser Unterfamilie, Integrin alphaV beta3, wird aufgrund seiner Bedeutung für die vorliegende Arbeit später noch detailliert eingegangen (siehe 1.8.2.1).

Allen Integrinen gemein ist ihr homologer Aufbau aus jeweils einer alpha und einer beta Polypeptidkette (siehe auch Abb. 1-4). Diese bestehen jeweils aus einer langen extrazellulären Domäne, einer kurzen Transmembrandomäne sowie einer zytoplasmatischen Domäne (Gille und Swerlick 1996; Humphries 2000; Takada et al. 1997). Die extrazelluläre Domäne der Integrin alpha Untereinheit enthält sieben Wiederholungen einer homologen Sequenz, durch welche bivalente Kationen wie Ca^{2+} und Mg^{2+} gebunden werden können. Hierdurch wird die Ligandenbindung der Integrine vermittelt (Humphries 1996). Die zytoplasmatische Domäne der Integrin alpha und beta Untereinheiten stellt die Verbindung der ECM mit dem Aktin-Zytoskelett der Zelle her. Durch die Rekrutierung einer Vielzahl von Struktur- und Adapterproteine können mit Hilfe der Integrine so extrazelluläre Signale in die Zelle hinein („outside-in signaling“), sowie intrazelluläre Signale aus der Zelle hinaus auf die Umgebung („inside-out signaling“) übertragen werden (Takada et al. 1997; Humphries 1996). Die Dimerisierung der alpha und beta Untereinheiten erfolgt über Wasserstoffbrückenbindungen an den N-terminalen Enden der Polypeptidketten. Erst als Heterodimer erlangen Integrine die Fähigkeit, Liganden zu binden. Dabei ist die Liganden-Bindungsaffinität im Vergleich zu anderen Zelloberflächenrezeptoren relativ schwach. Diese nur schwache Bindungsaffinität ermöglicht den Zellen ein schnelles Anheften an, sowie Lösen von der umgebenden Matrix, was für die Motilität der Zellen und auch für ihre Fähigkeit zur Invasion ausschlaggebend ist (Brakebusch und Fässler 2003).

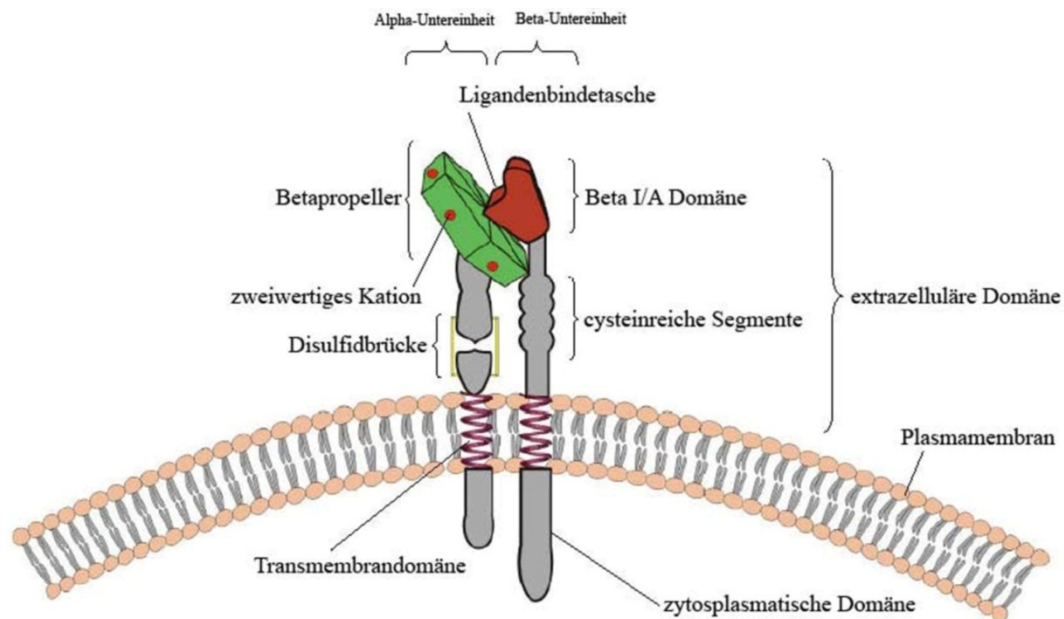


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung des Aufbaus von Integrinen (nach Kuphal et al. 2005, modifiziert).

Zusätzlich zu ihrer Funktion als Zelladhäsionsmoleküle, im Rahmen welcher sie den physischen Kontakt von Zellen zur ECM vermitteln, konnte den Integrinen auch eine wesentliche Bedeutung als Überträger von Signalen zwischen Zellen und ECM nachgewiesen werden (Gille und Swerlick 1996; Humphries 1996; Hynes 1992; Schwartz et al 1995). Diese Signalübertragung kann bi-direktional erfolgen und verleiht den Integrinen eine Bedeutung in zahlreichen zellulären Prozessen wie Proliferation, Zellpolarität, Zellwachstum und Migration (im Rahmen des „outside-in signalings“) aber auch Anoikis und Angiogenese (im Rahmen des „inside-out signalings“). So besitzen Integrine eine Schlüsselfunktion in der Melanomentwicklung (Seftor et al. 1999; Kuphal et al. 2005), da sie wesentlichen Einfluss auf die Migrationsfähigkeit der Tumorzellen, sowie das Überleben und die Proliferation des Tumors haben. Während der Transformation normaler Melanozyten in Melanomzellen ändert sich das Expressionsmuster der Integrine, wobei unter anderem die verstärkte Expression von Integrin $\alpha_5\beta_3$, $\alpha_4\beta_1$ und $\alpha_2\beta_1$ mit einem zunehmend metastatischen Phänotyp der Zellen einher geht (Moretti et al. 1993; Hartstein et al. 1997; Nikkola et al. 2004). Der Kontakt der Melanomzellen mit der Umgebung, vermittelt durch Integrine, ermöglicht dem Tumor den Übergang vom stationären Wachstum hin zum migratorischen, invasiven Wachstum, also von der radialen Wachstumsphase (RGP) in die vertikale Wachstumsphase (VGP). Für diesen Prozess ist die verstärkte Expression von Integrin $\alpha_5\beta_3$ ein spezifischer Marker.

1.8.2.1 Beteiligung der Integrin beta3 Untereinheit an der Progression des malignen Melanoms

Der Integrinrezeptor, welcher am engsten mit der Tumorprogression und der Metastasierung beim malignen Melanom in Verbindung gebracht werden konnte, ist Integrin alphaV beta3 (Johnson 1999). Es handelt sich dabei um den klassischen Vitronektin-Rezeptor, welcher an das RGD-Bindemotiv (bestehend aus den Aminosäuren Arg-Gly-Asp) im Vitronektin Molekül bindet. Im Anschluss an die Bindung assoziiert es mit Vinkulin, Talin und alpha-Aktinin zu fokalen Adhäsionsstellen (focal adhesion sites) am Ende von Aktin-Filamenten des Zytoskeletts. Dieses Clustern von Integrin alphaV beta3 auf der Zelloberfläche und die Ko-Lokalisation mit Elementen des Zytoskeletts führt zu Veränderungen der Zellmorphologie und des migratorischen Verhaltens der Zelle. Dabei ist ein NPXY (Asn-Pro-X-Tyr) Motiv in der beta3 Untereinheit (Aminosäuren 744 bis 747) essentiell für die Vermittlung migratorischer Prozesse (Filardo et al. 1995). Zusätzlich zu der Funktion als Mediator zwischen Bestandteilen der ECM und dem Zytoskelett der Zelle, stimuliert Integrin alphaV beta3 die Matrix-Invasion durch Bindung und Steuerung aktivierter MMP-2 (Seftor et al. 1992) und uPAR (Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator-Rezeptor) Moleküle (Nip et al. 1995). Weiterhin fördert dieses Integrin das Zellwachstum durch Assoziation mit verschiedenen Wachstumsfaktoren (Schneller et al. 1997) und ist auch an der Signaltransduktion beteiligt. Dabei führt die Aktivierung von Integrin alphaV beta3 z.B. zur Resistenz gegenüber Apoptose (Montgomery et al. 1994). Neben Vitronektin bindet es an eine Reihe weiterer ECM Moleküle (z.B. Fibronektin, Fibrinogen, Kollagen, Thrombospondin und von Willebrand Faktor) und ist ein Ligand für das Zelladhäsionsmolekül L1CAM (Montgomery et al. 1996). Sehr gut charakterisiert ist die Rolle von Integrin alphaV beta3 in der Tumorangiogenese. Wird dieser Rezeptor auf Endothelzellen blockiert, findet keine Tumor-induzierte Angiogenese und somit auch kein Tumorwachstum mehr statt (Brooks et al. 1994; Rüegg et al. 1998).

Die Expression von Integrin alphaV beta3 in Melanomtumoren wird mit deren Übergang zur Metastasierung in Verbindung gebracht. Während die alphaV Untereinheit gleichbleibend exprimiert wird, stellt die Expression der beta3 Untereinheit einen der deutlichsten molekularen Marker für den Übergang von der radialen in die vertikale Wachstumsphase dar (Albelda et al. 1990; Danen et al. 1995; Danen et al. 1994; van Belle 1999; Natali et al. 1995). Immunhistochemische Färbungen zeigen, dass normale Melanozyten und dysplastische Nävi, sowie der Großteil an Primärtumoren die beta3 Kette nicht exprimieren, während metastasierende Melanome bzw. Melanomzellen der Invasionsfront eine starke Integrin beta3 Expression zeigen. Die Integrin beta3 Expression gilt deshalb als Indikator für

eine schlechte Prognose und ein kurzes rezidivfreies Intervall (Hieken et al. 1996; Hieken et al. 1999; Natali et al. 1997).

Während die diagnostische Situation klar definiert ist, konnte die Bedeutung der Integrin beta3 Expression für die Melanomzellen noch nicht vollständig geklärt werden. Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Ergebnissen konnte in einigen Melanomzelllinien eine inverse Korrelation von Integrin beta3 Expression und ihrem invasiven Potenzial *in vitro* bzw. ihrem metastatischen Potenzial *in vivo*, beobachtet werden (Danen et al. 1995; Danen et al. 1996; Boukerche et al. 1994). Dabei waren metastatische Zelllinien Integrin beta3 negativ und verloren nach Transfektion eines Integrin beta3 Expressionsplasmids die Fähigkeit zur Bildung von Metastasen in einem Maus-Melanommodell. Dagegen zeigten die *in vitro* und *in vivo* nicht bzw. kaum metastatischen Zelllinien eine starke Integrin beta3 Expression. Weiterhin konnten durch Überexpression von Integrin beta3 in Zelllinien, welche aus Melanomen in der radialen Wachstumsphase isoliert wurden, diese zu einem Phänotyp transformiert werden, der Zelllinien aus Melanomen der vertikalen Wachstumsphase entsprach (Hsu et al. 1998). Integrin beta3 scheint Melanomzellen somit das für die Metastasierung nötige migratorische und invasive Potenzial zu verleihen, welches sie für den Übergang von der radialen in die vertikale Wachstumsphase benötigen. Dies entspricht den oben geschilderten, molekularen Beobachtungen, in welchen Integrin beta3 für die Migration von Zellen entlang der ECM verantwortlich ist, sowie über physikalische Interaktion mit Matrix-degradierenden Enzymen die Penetration der ECM ermöglicht.

1.9 Regulation der Adhäsion von Melanomzellen an die ECM: Das Protein MIA

Das Protein MIA (melanoma inhibitory activity) wurde erstmals aus der humanen Melanomzelllinie HTZ-19 isoliert (Blesch et al. 1994) und bildet zusammen mit seinen Homologen OTOR (Rendtorff et al. 2001; Robertson et al. 2000; Cohen-Salmon 2000), TANGO (Bosserhoff et al. 2004) und MIA2 (Bosserhoff et al. 2003) eine Proteinfamilie.

MIA ist ein 11 kDa großes Protein, welches über Exozytose in den extrazellulären Raum sezerniert wird. NMR (nuclear magnetic resonance) Analysen konnten zeigen, dass die dreidimensionale Struktur von MIA eine Faltung ähnlich zu SH3-Domänen aufweist. Dabei wird sie durch zwei zusätzliche Disulfidbrücken stabilisiert. Zwar ist die SH3-Domäne ein bekanntes Strukturmotiv vieler intrazellulärer Signalmoleküle, jedoch ist MIA das erste extrazelluläre Protein, welches diese Struktur zeigt (Bosserhoff 2005).

Seinen Namen erhielt MIA aufgrund erster Untersuchungen, welche auf eine hemmende Wirkung des Proteins auf die Proliferation und Migration von Melanomzellen *in vitro* hinwies (Blesch 1994). Spätere Analysen hingegen zeigten, dass MIA keine Melanom-inhibierende

Funktion besitzt, sondern im Gegenteil zu einer verstärkten Invasivität und Metastasierung *in vivo* führt. Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass MIA durch Besetzen von Integrin Binde-Epitopen in der ECM sowie durch Regulation der Integrin Aktivität das Anheften und Ablösen von Melanomzellen an Moleküle der ECM reguliert. Auf diese Weise verleiht es den Zellen eine erhöhte Motilität und Invasivität (Bauer et al. 2006; Bosserhoff et al. 2003; Stoll et al. 2001; Bosserhoff et al. 2001; Guba et al. 2000). Neueste Ergebnisse legen nahe, dass MIA von der Zelle aktiv nur an einem ihrer Pole ausgeschüttet wird. An diesem „hinteren“ Zellpol (in Abhängigkeit von der Bewegungsrichtung der Zelle gesehen) bindet MIA an Bestandteile der ECM bzw. an die Integrinrezeptoren selbst und führt somit zu einem Lösen der Zell-Matrix-Kontakte. Anschließend „neigt“ sich die Zelle nach vorne, wo im Folgenden unter Abwesenheit von MIA die Integrine auf der Zelloberfläche an die ECM binden können. Auf diese Weise kann sich die Melanomzelle entlang der ECM-Bestandteile bewegen (Schmidt et al., zur Veröffentlichung akzeptiert). Betrachtet man dieses Modell, wird deutlich, weshalb MIA in ersten Versuchen eine Melanom-inhibierende Wirkung ausübte. Im Rahmen dieser Versuche wurde rekombinantes MIA Protein in relativ hoher Konzentration eingesetzt. Durch das ubiquitäre Vorhandensein von MIA Molekülen in großer Anzahl im Zellkulturmedium, wurden vermutlich alle Integrinbindestellen bzw. Integrinrezeptoren besetzt, wodurch zum einen die Zellanhaftung an die Zellkulturgefäße und somit auch das Zellwachstum verhindert wurde, und zum anderen die Zellen in Migrationsassays nicht mehr wandern konnten (Bosserhoff et al. 2005).

Entsprechend der Funktion von MIA wird es von normalen Melanozyten nicht exprimiert, während die Induktion der MIA Expression in Melanomzellen in Korrelation zur Tumorprogression erfolgt. Somit stellt die Bestimmung der MIA Konzentration im Serum von Melanompatienten einen verlässlichen Marker zur Detektion und Überwachung der Metastasierung dar (Bosserhoff et al. 1997).

Dass MIA eine wesentlich weitreichendere Rolle bei der Melanomprogression zukommt als die Regulation der Zelladhäsion bzw. -migration, wurde festgestellt, als im Rahmen der oben beschriebenen Analysen ein Knockdown der MIA Expression durch Transfektion eines antisense-Plasmids in Zellen der HMB2 Melanomzelllinie durchgeführt wurde (Poser et al. 2004; Tatzel et al. 2005). Die MIA-defizienten Zellklone HMB2-MIA5 und HMB2-MIA8 wuchsen dabei sowohl in Monolayer-Kulturen als auch im 3D-Sphäroid-Modell in Zellaggregaten. Dies stellte einen starken Gegensatz zu dem unstrukturierten, zerklüfteten Wachstumsmuster von Melanomzellen im Allgemeinen, und der parentalen HMB2-Zelllinie im Speziellen, dar und gab einen Hinweis auf eine Wiederausbildung von Zell-Zell-Kontakten. Weitere Veränderungen im Phänotyp der antisense-MIA (as-MIA) Klone waren ein wesentlich reduzierter Zelldurchmesser, das Vorhandensein von nur einem einzelnen Zellkern, sowie die Ausbildung dendritischer Zellausläufer, ähnlich derer von Melanozyten

(Poser et al. 2004). Auffälligstes Merkmal war die Wiederaufnahme der Pigmentsynthese, welche durch re-induzierte TRP-1 und Tyrosinase Expression bedingt war. Letztere resultierte vermutlich aus einer Verminderung der PIAS3 (protein inhibitor of activated STAT, 3) und einer Induktion der PAX3 (paired box protein 3) Expression (Tatzel et al. 2005). Diese Veränderungen weisen MIA zusätzlich eine Funktion in der Regulation von Mechanismen der Melanozyten-Differenzierung und -Pigmentierung zu. Sowohl cDNA- als auch Protein-Array Daten zeigten einen hohen Grad an Übereinstimmung der Expressionsprofile von Melanozyten und MIA-defizienten Zellklonen (Poser et al. 2004). Eine Vielzahl Melanom-relevanter Gene wurden in den MIA-defizienten Zellklonen vermindert oder überhaupt nicht mehr exprimiert, so z.B. MT1-MMP (membrane type-1 matrix metalloproteinase), t-PA (tissue plasminogen activator), Integrin beta3, SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine), Fibronectin, L1CAM (L1 cell adhesion molecule), Proteinkinase C alpha und MCAM (melanoma cell adhesion molecule). Außerdem erfolgte ein Wechsel von der N-Cadherin zurück zur E-Cadherin Expression (zu dessen Bedeutung siehe auch 1.8.1.1). Umgekehrt konnte in Melanozyten durch Behandlung mit rekombinantem MIA in moderaten Dosen die Expression oben genannter Gene induziert werden. MIA-behandelte Melanozyten waren zusätzlich zur Migration befähigt. In immunhistochemischen Untersuchungen zeigte sich, dass MIA zwar bereits von einigen Nävi und von allen untersuchten, kleinen Primärtumoren, nicht jedoch von normalen Melanozyten exprimiert wurde. Dies alles deutet auf die Induktion der MIA-Expression als sehr frühen Schritt in der Tumorigenese des malignen Melanoms hin. Dafür spricht auch, dass MIA-transfizierte primäre Melanozyten unempfindlich für pro-apoptotische Signale werden. Lösen sich in der Epidermis primäre Melanozyten von ihrem angestammten Platz auf der Basallamina ab (siehe 1.1), führt dies unter normalen Umständen zum Zelltod durch Anoikis. Die Behandlung der Melanozyten mit rekombinantem MIA führte zu einer Verminderung der Expression von Apaf-1 (apoptotic peptidase activating factor 1) und seinem Regulator E2F-1 (E2F transcription factor 1), wodurch MIA-behandelte Melanozyten resistent gegen diesen Mechanismus werden (Poser et al. 2004).

Aufgrund dieser Ergebnisse wird das HMB2/HMB2-MIA Zellsystem in unserer Arbeitsgruppe als Modellsystem für frühe Mechanismen der Melanomentstehung angewendet. Meist werden die MIA-defizienten Zellklone zusätzlich zu primären Melanozyten verwendet, da sie wesentliche Vorteile bieten. Zum einen zeigen sie ein schnelleres Wachstum, wobei sie zusätzlich auch höhere Zelldichten erreichen. Dadurch stehen stets ausreichend hohe Zellzahlen für Versuche zur Verfügung. Zum anderen lässt sich bei Transfektion von Zellen dieses Typs eine wesentlich höhere Transfektionseffizienz erreichen. Das HMB2/HMB2-MIA Zellsystem ist somit ein handliches und aussagekräftiges Modellsystem für die Untersuchung früher Ereignisse in der Melanomentstehung.

1.10 Aufrechterhaltung der Zellpolarität: Das Protein Hugl-1 im malignen Melanom

Der Verlust der apikal-basalen Polarität von Zellen ist eines der Hauptkennzeichen für aggressive und invasive Tumore (Thiery 2002). Während der Progression epithelialer Tumoren durchlaufen die Zellen an der invasiven Front eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT; siehe auch 1.8.1.2), die unter anderem durch einen Verlust dieser Zellpolarität und ein erhöhtes migratorisches Potenzial gekennzeichnet ist. Ein Protein, welches bei diesen Prozessen vermutlich eine wesentliche Rolle spielt, ist Hugl-1 (Human giant larvae; Lgl), welches homolog zu dem *Drosophila* Protein Lgl (Lethal giant larvae) ist (Strand et al. 1994a, 1994b). Lgl ist in *Drosophila melanogaster* an der Aufrechterhaltung der Zellpolarität und der Regulation der Zellproliferation in epithelialen und neuronalen Geweben beteiligt (Bilder et al. 2000). Der Verlust des Proteins führt in *Drosophila* zu unkontrollierten Wucherungen des larvalen Gehirns und den Epithelien der Imaginalscheiben. Dabei zeigen diese Wucherungen starke Ähnlichkeiten zu den *in situ* Karzinomen der Säugetiere (Agrawal et al. 1995; Wodarz 2000). Werden Zellen aus dieser tumorösen Masse in Wildtyp-Fliegen verpflanzt, verhalten sie sich dort wie metastatische Tumorzellen – sie migrieren an beliebige Stellen im Körper der Fliege und bilden dort Wucherungen aus, welche zum Tode des Tieres führen (Woodhouse et al. 1998).

Das humane Lgl-Homolog Hugl-1 ist ein größtenteils Membran-assoziiertes Protein, welches Homo-Oligomere bildet und einen Bestandteil des Zytoskeletts darstellt (Strand et al. 1995). Es konnte gezeigt werden, dass Lgl-Homologe in Säugetieren Komplexe mit Par6/aPKC (partitioning defective 6 homolog / atypische Proteinkinase C) bilden und so die epitheliale Zellpolarität regulieren (Plant et al. 2003; Yamanaka et al. 2003). Dabei wird Lgl durch die atypische Proteinkinase C phosphoryliert, nachdem die Zelle durch Zell-Zell-Kontakte polarisiert wurde. Lgl dissoziiert daraufhin vom Par6/aPKC Komplex und ordnet sich entlang der basolateralen Membran an. Dort ist es am Aufbau der basolateralen Membrandomäne (Tanentzapf und Tepass 2003; Hutterer et al. 2004) und der korrekten Positionierung epithelialer Zell-Zell-Kanäle (Borg 2004) beteiligt.

Im malignen Melanom konnte ein Verlust der Hugl-1 Expression festgestellt werden, wobei dieser mit der Melanomprogression korrelierte (Kuphal et al. 2006). Re-Expression von Hugl-1 in Melanomzellen führte zu einer verminderten Motilität der Zellen, hatte aber keinen Einfluss auf die Proliferationsrate. Außerdem konnte in den transfizierten Zellen eine veränderte Expression von EMT-assoziierten Molekülen festgestellt werden. Dabei war die Expression von MMP 9 und MMP 14 (MT1-MMP), sowie von Fibronectin, notch4 und beta-Catenin vermindert, wohingegen eine gesteigerte Expression von E-Cadherin beobachtet wurde. Dies legt eine Beteiligung von Hugl-1 an Vorgängen der EMT nahe, die zur Autonomie transformierter Melanozyten von der Kontrolle durch die Keratinozyten und zur

Dissemination von Melanomzellen führen kann. Hg1-1 wurde deshalb eine Rolle als Tumorsuppressor im malignen Melanom zugeschrieben.

1.11 Transkriptionsfaktoren

Eine Hauptursache für veränderte Genaktivität, welche zur malignen Transformation von Zellen führen kann, stellt die fehlregulierte Expression bzw. Aktivität von Transkriptionsfaktoren dar. Diese sind durch ihre Kontrolle der Genexpression auf transkriptioneller Ebene zur Aktivierung oder Reprimierung einer Vielzahl von Genen aus den Bereichen Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose befähigt und können somit die Tumorentstehung und Metastasierung wesentlich beeinflussen. Zusätzlich kann es zu weiteren Modifikationen in der Zelle kommen, wenn Moleküle aus anderen, verknüpften Signalwegen reguliert werden. Es konnten bereits diverse Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, deren Fehlregulation eine Rolle in der Entstehung und Progression des malignen Melanoms spielt. Einige dieser Faktoren werden im Folgenden näher charakterisiert.

Die **AP-1** (activation protein 1) Familie der Transkriptionsfaktoren besteht aus den Untergruppen Jun (c-Jun, JunD, JunB) und Fos (c-Fos, Fra-1, Fra-2 und FosB). Diese bilden Heterodimere, binden an die Konsensus Sequenz 5'-TGA(C/G)TCA-3' im Promotor-Bereich ihrer Zielgene und aktivieren so deren Transkription (Nakabeppu et al., 1988). Im malignen Melanom fördert eine verstärkte Expression des Onkogens *fos* die Progression und dabei speziell die Invasivität der Tumorzellen. Ein Zielgen von AP-1 ist beispielsweise die Matrixmetalloproteinase (MMP) 7 (Urabe et al., 1992).

Die Familie der **AP-2** (activating enhancer binding protein 2) Transkriptionsfaktoren besteht aus fünf Mitgliedern (AP-2 alpha, beta, gamma, delta und epsilon), wobei im Melanom bisher nur die Funktion von AP-2 alpha im Detail analysiert wurde. AP-2 bindet als Dimer an die DNA Konsensus-Sequenz 5'-GCCNNNGGC-3' und kann sowohl aktivierend als auch reprimierend auf die Transkription von Zielgenen wirken. Im Melanom fungiert AP-2 als Tumorsuppressor. Da AP-2 als positiver Regulator von c-KIT (stem cell factor receptor) wirkt, führt der Verlust der AP-2 Expression im fortgeschrittenen Stadium des Melanoms zu einer verminderten Expression von c-KIT. Dadurch verlieren Melanomzellen ihre Sensitivität gegenüber KIT Ligand / SCF (stem cell factor) induzierter Apoptose und zeigen einen Phänotyp von verstärkter Malignität (Huang et al. 1998). Weitere Zielgene von AP-2 sind z.B. E-Cadherin, MMP 2, PAR-1 (protease-activated receptor 1) und MCAM (melanoma cell adhesion molecule) (Bar-Eli 2001; Jean et al. 1998).

Etwa 30 Mitglieder umfasst die Familie der **Ets** Transkriptionsfaktoren (z.B. Ets-1, Ets-2, Erg, Elf-1, Elk-1, Fli-1 und PEA3). Ihnen allen gemein ist eine hoch homologe Ets-Domäne, mit

welcher sie spezifisch an die DNA Sequenz 5'-GGAA/T-3' binden. Der Großteil der Ets Faktoren wird Ras/MAP-Kinase abhängig phosphoryliert und aktiviert (Oikawa 2004). In Melanomzellen liegt im Vergleich zu Melanozyten eine verstärkte Ets-1 Expression und Aktivität vor. Dabei aktiviert Ets-1 die Transkription einer Reihe von Genen, welche an Tumordinvasion und Metastasierung beteiligt sind, wie MMP 1, 3, 7 und 9, den Urokinase-Typ des Plasminogenaktivators (uPA) (Oikawa 2004; Rothhammer et al. 2004), sowie die Expression des Wachstumsfaktors BMP 4 (bone morphogenetic protein 4) (Rothhammer et al. 2005). Weiterhin spielt Ets-1 eine wichtige Rolle in der Tumorangio-genese (Oikawa 2004).

MITF (microphthalmia-associated transcription factor) erkennt als DNA-Bindemotiv die so genannte "M-Box" mit der Sequenz 5'-AGTCATGTG-3'. Es sind bisher sechs Isoformen dieses „basic helix-loop-helix Leucin Zipper“ Transkriptionsfaktors bekannt: MITF-A bis D, MITF-H und MITF-M, wobei in Melanozyten und Melanomzellen spezifisch die M-Isoform exprimiert wird. MITF ist essenziell für das Überleben und die Differenzierung von Melanozyten (Levy et al. 2006; Steingrimsson et al. 2004). Die Rolle von MITF in der Melanomentstehung und -progression konnte hingegen noch nicht klar definiert werden. Zielgene von MITF sind die an der Melaninsynthese beteiligten Proteine Tyrosinase, TRP1 (tyrosinase related protein 1) und DCT (dopachrome tautomerase). Weiterhin reguliert MITF die Expression von Bcl-2, was zu einem verbesserten Überleben von Melanomzellen führt (McGill et al. 2002).

Ein zentraler Regulator unterschiedlichster Gene und Funktionen im Melanom ist der Transkriptionsfaktor **NFkappaB** (nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells). Es handelt sich dabei um einen homo- oder heterodimeren Komplex, der aus Proteinen der Rel-Familie besteht. Kennzeichen der Untereinheiten ist die REL-Homologie-Domäne (RHD), innerhalb derer sich i) die DNA-Bindestelle, ii) das Kernlokalisierungssignal (NLS), welches von IkappaB Proteinen erkannt wird, sowie iii) die Dimerisierungsregion und iv) die Transkription modulierende Region befinden. Es wurden fünf Mitglieder der NFkappaB / Rel-Familie beschrieben, wobei in Säugetieren am häufigsten ein Heterodimer aus p50/p65 auftritt. Im malignen Melanom liegt eine konstitutive Aktivierung von NFkappaB vor, die zum Beispiel zu einer Expressionssteigerung von anti-apoptotischen Proteinen wie TRAF 1 und 2 (tumor necrosis factor receptor-associated factor), IAP1 und 2 (inhibitor of apoptosis), ML-IAP (melanoma IAP), Survivin und Bcl-2 ähnlichen Proteinen führt. Durch Regulation der Expression von Cyclin D1 hat NFkappaB Einfluss auf die Modulation des Zellzyklus und kann die Proliferation initiieren. Weiterhin wirkt NFkappaB als Mediator zwischen Melanomzellen und dem Tumorgefäßsystem und aktiviert Mediatoren der Invasivität und Metastasierung des malignen Melanoms (Amiri und Richmond 2005; Kuphal und Bosserhoff 2006).

1.11.1 Die Familie der Homeobox-Transkriptionsfaktoren

Homeobox-Transkriptionsfaktoren sind vor allem an der Genregulation während der Embryonalentwicklung beteiligt und werden durch die Homeobox-Gene codiert. Eine Vielzahl unterschiedlicher Homeobox-Gen Familien konnte bisher identifiziert werden, z.B. HOX, EMX, PAX, MSX, sowie weitere, einzelne Homeobox-Gene. Gemeinsames Kennzeichen ist die sogenannte „Homeobox“, eine 183 Basenpaare lange DNA-Sequenz, welche für die 61 Aminosäuren der Homeodomäne codiert und ursprünglich in *Drosophila* entdeckt wurde. Die Homeodomäne ist meist am Carboxy-terminalen Ende des Homeoproteins lokalisiert und vermittelt die Erkennung und Sequenz-spezifische Bindung der DNA (Hueber und Lohmann, 2008). Dabei faltet sie in drei alpha-Helices, wobei zwei davon ein typisches Helix-Turn-Helix Motiv bilden, welches in die große Rinne der DNA-Doppelhelix binden kann (siehe Abb. 1-5 A). Die dritte Helix steht zu diesen beiden Helices im 90° Winkel und fungiert als Erkennungshelix, welche zum einen die für die Bindestelle aller Homeobox-Transkriptionsfaktoren typische Sequenz 5'-TAAT-3' und zum anderen eine für jedes Homeoprotein spezifische Sequenz erkennt. Die Spezifität dieser Bindung erlaubt jedem Homeo-Transkriptionsfaktor ein definiertes Set an Genen zu aktivieren oder zu reprimieren. Durch Sequenz-Homologien in den Homeodomänen selbst bzw. deren flankierenden Regionen können unterschiedliche Klassen von Homeodomänen unterschieden werden, welche jeweils eine eigene Homeobox-Gen Familie bilden (Cillo, 2001). Die bekannteste dieser Familien besteht aus den klassischen HOX-Genen, welche sich durch die Klasse I Homeodomäne auszeichnen. Letztere besitzt die Konsensus-Sequenz der *Drosophila Antennapedia* (Antp) Homeodomäne. Diese Homeobox-Gen Familie zeigt eine einzigartige Organisation in hochstrukturierten Genclustern. Der Mensch besitzt mindestens 39 HOX Gene, welche in vier getrennten, paralogenen Genclustern von jeweils ca. 100kb Länge, den HOX-Loci, organisiert sind. Diese liegen auf unterschiedlichen Chromosomen, wobei der HOX-A Locus auf Chromosom 7p15.3, HOX-B auf 17p21.3, HOX-C auf 12q13.3 und HOX-D auf 2q31 liegen (siehe Abbildung 1-5 B). Jeder Locus besteht dabei aus einer homolog zueinander angeordneten Reihenfolge von 9 bis 11 HOX-Genen (Apiou et al. 1996; Scott 1992). Es wird davon ausgegangen, dass alle HOX-Gene im Laufe der Evolution durch Duplikation aus einem gemeinsamen Vorfahren (ähnlich zum *Drosophila* HOM-C Komplex) entstanden sind und strukturelle, sowie funktionelle genomische Module bilden, welche als regulatorische Netzwerke agieren (Stuart et al. 1995).

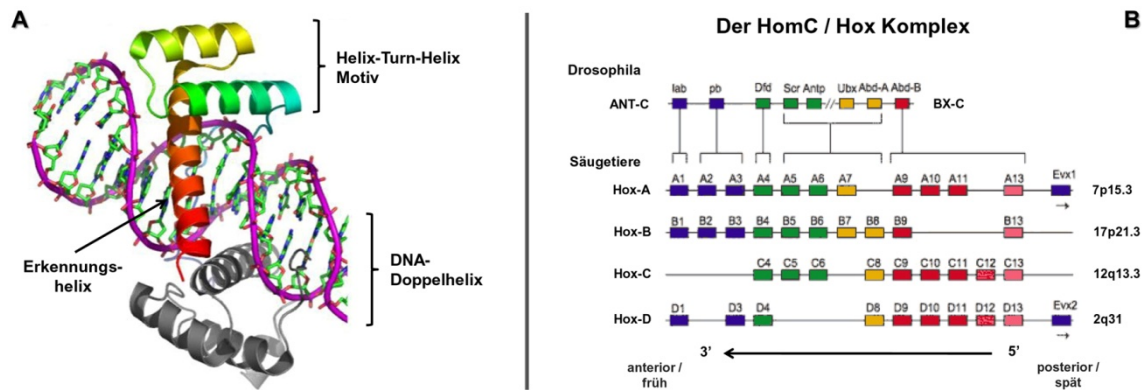


Abbildung 1-5: Die Homeobox-Transkriptionsfaktoren. (A) Schematische Darstellung der Bindung eines HOX-Proteins an die DNA-Doppelhelix (Quelle: www.meilerlab.org; modifiziert). **(B)** Schematische Darstellung der Organisation der HOX-Gene in paralogen Genclustern (Quelle: www.scienceblogs.com; modifiziert).

Während der Embryonalentwicklung von Säugetieren ist die zeitlich und räumlich definierte, differenzielle Expression der HOX-Gene Grundlage für Ausbildung, Anordnung und Identität der Körpersegmente. Dabei werden die HOX-Gene in der Reihenfolge ihrer Anordnung innerhalb der Chromosomenbereiche von 3' nach 5' aktiviert. Die weiter 3' liegenden Gene sind hierbei für die frühen Prozesse und die anterioren Regionen verantwortlich, während die am 5' Ende des Clusters liegenden Gene Vorgänge in der späteren Entwicklung und in den posterioren Regionen lenken (Graham et al. 1989; Dekker et al. 1992). Zusätzlich zu ihrer Rolle in der Embryonalentwicklung sind die HOX-Gene jedoch auch in wichtige biologische Prozesse in adulten eukaryotischen Organismen, wie Kontrolle der Zell-Identität (Pattyn et al. 2000), Zellwachstum und -differenzierung (Magli et al. 1991), sowie Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen (Srebrow et al. 1998) involviert. Dementsprechend führen Mutationen in Homeobox-Genen zu angeborenen (Mortlock und Innis 1997), somatischen (Nakamura et al. 1996) oder metabolischen (Ferber et al. 2000) Defekten.

Krebserkrankungen betreffend konnte eine deregulierte Expression von HOX-Genen in Lymphomen, sowie einer großen Anzahl solider Tumoren von beispielsweise Niere, Darm und Lunge festgestellt werden (Bijl et al. 1997; Iida et al. 1996; Cillo 1994-95). Dabei scheinen Veränderungen der HOX-Gen Expression mit Tumorstadium und histologischem Tumortyp zu korrelieren. Generell wurde den HOX-Genen eine Rolle in den späteren Prozessen der Tumorprogression, vor allem beim Übergang zum metastatischen Wachstum zugeschrieben. Auch ein „regulatorischer Loop“ zwischen HOX-Genen und Wachstumsfaktoren, Cytokinen und Zell-Adhäsionsmolekülen, sowie eine Verbindung zum Ras-Signalweg wurden postuliert (Cillo et al. 2001). Über die Bedeutung einer deregulierten HOX-Gen Expression im malignen Melanom stehen bisher nur wenige Daten zur Verfügung. Zum einen konnte gezeigt werden, dass Melanomzelllinien auf der Basis ihres HOX-Expressionsmusters korrekt in niedrig und hoch invasive Zelllinien klassifiziert werden

können (Cillo et al. 1996). Zum anderen wurde eine gesteigerte Expression von HOX-A11, A13, B9, D12 und D13 in Melanom-Gewebeproben im Vergleich zu Nävi, sowie eine stark erhöhte Expression von HOX-A1, A2, C4 und B13 in Melanomen, welche bereits Metastasen gebildet hatten, festgestellt (Maeda et al. 2005). Desweiteren ist bekannt, dass Melanomzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine konstitutive Expression von HOX-B7 zeigen. Dabei bindet HOX-B7 an eine von fünf putativen Bindestellen im bFGF Promotor und induziert so die Expression dieses Wachstumsfaktors in Melanomzellen (Carè et al. 1996). Eine Behandlung von Melanomzellen mit antisense-Nukleotiden gegen HOX-B7 führte zu einer Verringerung der Zellproliferation um 60 bis 80%.

1.12 Posttranskriptionelle Regulation der Genexpression durch miRNAs

Zusammen mit einer neuen Klasse kleiner, nicht-kodierender RNAs – der so genannten microRNAs (miRNAs; „micros“: griech. klein) – wurde ein zusätzlicher, bis dato völlig unbekannter Mechanismus zur Regulation der Genexpression entdeckt und das Forschungsfeld der Genregulation zumindest in weiten Teilen revolutioniert. Der Ursprung dieser zu Beginn relativ unbeachteten Entdeckung geht in das Jahr 1993 zurück, als die Labore von Victor Ambros und Gary Ruvkun parallel von einem kleinen, 21 Nukleotide langen RNA Molekül berichteten, welches nicht für ein Protein kodierte, sondern regulatorisch auf die Expression einer korrelierten mRNA wirkte (Lee et al. 1993; Wightman et al. 1993). Bereits seit den frühen 1980er Jahren war bekannt, dass *C. elegans* Stämme mit einer „loss-of-function“ Mutation eines später als *lin-4* bezeichneten Gens starke Störungen in ihrer Ontogenese vom Embryo, über die larvalen Stadien (L1 bis L4), hin zum adulten hermaphroditischen Wurm zeigten (Chalfie et al. 1981). Ebenfalls war zu dieser Zeit bereits bekannt, dass „gain-of-function“ Mutationen eines weiteren heterochronen Gens (also eines Gens, dessen Veränderung zu einer Störung des Zusammenhanges zwischen morphologischen Phänotypen und dem relativen Zeitablauf im Entwicklungsprogramm eines Organismus führt), genannt *lin-14*, zu einem sehr ähnlichen Wurm-Phänotyp führten (Ambros und Horvitz 1984). Unter intensivem Austausch von Daten und Ideen zwischen den Laboren von Ambros und Ruvkun, konnten sie und ihre Mitarbeiter eine Funktion von *lin-4* als Negativ-Regulator der *lin-14* Expression demonstrieren (Ruvkun und Giusto 1989). Dabei stellten sie fest, dass Mutationen, welche zu einem „gain-of-function“ von *lin-14* führten, stets die 3'UTR im kodierenden Gen betrafen, wobei die Kopienzahl, in welcher das *lin-14* Transkript in den Zellen vorlag, nicht beeinflusst wurde (Wightman et al. 1991; Arasu et al. 1991). Dies lies eine Inhibierung der Translation der *lin-14* mRNA durch Interaktion von *lin-4* mit der 3'UTR des Transkriptes vermuten. Als die Gruppe von Viktor Ambros zusätzlich

zeigen konnte, dass das *lin-4* Gen für eine sehr kurze RNA kodierte, kam erstmals die Vermutung über eine RNA:RNA Interaktion auf. Als die Forscher beider Gruppen im Juni 1992 ihre unabhängig voneinander generierten Sequenzen von *lin-4* und der *lin-14* 3'UTR austauschten, entdeckten sie eine Komplementarität der Sequenz von *lin-4* zu fünf Abschnitten in der *lin-14* 3'UTR, welche jeweils einige Nukleotide lang waren. Die „gain-of-function“ Mutationen des *lin-14* Gens betrafen dabei stets diese komplementären Bereiche, die vermuteten Interaktionsstellen beider RNA Stränge. Durch Reporter-gen Studien konnte anschließend tatsächlich eine Bindung des *lin-4* Genproduktes an diese definierten Target-Sequenzen in der 3'UTR des *lin-14* Transkriptes und eine auf diese Weise vermittelte Hemmung der Translation der mRNA in funktionelles Protein aufgezeigt werden (Wightman et al. 1993). Trotz der Veröffentlichung eines Nature „News and Views“ Artikels über die parallel erschienenen Cell Publikationen von Lee und Wightman, in welchem Marv Wickens die Vermutung äusserte, es könnte sich bei der Entdeckung von Ambros und Ruvkun um einen generellen Mechanismus, welcher sich nicht nur auf die Regulation von *lin-14* durch *lin-4* beschränkte, handeln (Wickens und Takayama 1994), wurde das hier erstmals beschriebene und später als „miRNA vermitteltes Gensilencing“ bezeichnete Phänomen lange Zeit als ein für die Regulation der heterochronen Gene von *C. elegans* spezifischer Mechanismus angesehen. Selbst als Reinhart und Kollegen im Jahr 2000 eine weitere miRNA, *let-7*, entdeckten (Reinhart et al. 2000), wollten noch nicht einmal Ambros und Ruvkun selbst an einen Mechanismus von genereller Bedeutung denken, denn *let-7* war in die Regulation desselben heterochronen *C. elegans* Regulationsweges involviert. Erst als sich herausstellte, dass sowohl die Sequenz von *let-7* als auch die Sequenz der zugehörigen Bindestellen in der 3'UTR ihres Zielgens *lin-41* (Homologe: *dpld* in *D. melanogaster*; TRIM71 in *Homo sapiens*) über diverse Phyla hinweg – von *Drosophila* bis hin zu Säugetieren einschließlich des Menschen – konserviert vorliegen (Pasquinelli et al. 2000; Slack et al. 2000), wurde eine „miRNA Revolution“ in Gang gesetzt („The microRevolution“ betitelte Nature Genetics eine Ausgabe seines Supplements im Jahre 2006). Dabei zielte der überwiegende Teil dieser völlig neuen Forschungsrichtung zu Beginn auf eine detaillierte Analyse der molekularen Grundlagen für den meist als „miRNA vermitteltes Gensilencing“ oder aber „miRNA vermittelte post-transkriptionelle Regulation der Genexpression“ bezeichneten Mechanismus. Aufgrund intensiver Forschungsarbeit und methodischen Erfindungsreichtums, konnte eine große Menge an Daten gesammelt werden, die den Ablauf der Biogenese von miRNAs, ihre Interaktion mit den korrelierten Ziel-mRNAs, sowie die letztlich zur Hemmung der Proteinproduktion führenden Mechanismen – wenn auch nicht bis ins Detail – nachzuvollziehen helfen. Im Folgenden werden diese Erkenntnisse zusammenfassend dargestellt, wobei auch gezielt auf die vielen bisher noch offenen Fragen und ungeklärten molekularen Zusammenhänge hingewiesen wird.

1.12.1 miRNA Biogenese

MicroRNAs sind endogene nicht-kodierende RNA Spezies. Dabei kann die jeweilige miRNA als eigenes Gen (monocistronisch) vorliegen, in einem Cluster zusammen mit anderen miRNAs von einem gemeinsamen Promotor aus transkribiert werden (polycistronisch) oder in einem Intron eines proteinkodierenden Gens, mit welchem sie gemeinsam transkribiert wird, lokalisiert sein (intronisch) (Filipowicz et al. 2008). In ersteren beiden Fällen wird das miRNA Gen durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase II (RNA-Pol II) transkribiert, wodurch ein typisches RNA-Pol II Transkript mit 5'-terminaler 7-Methylguanosin Kappe und 3'-terminalem Poly-A Schwanz entsteht. In seltenen Fällen kann die Transkription von miRNA Genen auch durch RNA-Pol III vermittelt werden (Lee et al. 2004, Borchert et al. 2006). Dieses, bis zu mehreren Kilobasen lange, primäre Transkript wird als pri-miR (primary miRNA transcript) bezeichnet. Es faltet in Haarnadelstrukturen, welche doppelsträngiger RNA ähnlich sind und enthält die späteren miRNAs als imperfekte „stem-loop“ Strukturen, eine charakteristische Sekundärstruktur einzelsträngiger RNA (siehe Abbildung 1-6). Diese stem-loop Strukturen werden bei der Prozessierung der pri-miRNA durch den Mikroprozessorkomplex bestehend aus dem Enzym Drosha (eine Endonuklease vom RNase III Typ; auch bekannt als RN3) und seinem Cofaktor DGCR8 (DiGeorge syndrom critical region on chromosome 8; Homolog zum Pasha Protein in *D. melanogaster*) ausgeschnitten. Sie liegen dann als ca. 60 bis 80 Basenpaare lange Haarnadel-Strukturen vor, welche als pre-miRs (precursor miRNAs) bezeichnet werden (Bushati et al. 2007; Rana 2007; Du und Zamore 2005; Peters und Meister 2007). Pre-miRs können auch unter Umgehung der Drosha/DGCR8 Prozessierung entstehen, wenn miRNAs in einem Intron eines proteinkodierenden Gens (sogenannte „miRtrons“) kodiert sind (Ruby et al. 2007; Okamura et al 2007; Berezikov et al. 2007). In diesem Falle wird die Haarnadelstruktur der pre-miR beim Splicing des primären Gentranskriptes frei (Okamura et al. 2007). Unabhängig von dem Syntheseweg, auf welchem die pre-miR entstanden ist, wird sie im Anschluss mittels des Ran-GTP (Ran-Guanin Triphosphatase) abhängigen Nuklear-Export-Faktors Exportin5 aus dem Zellkern in das Zytoplasma der Zelle transportiert. Dort entsteht durch Spaltung mittels eines weiteren RNase III Enzyms namens Dicer, im Komplex mit seinem Cofaktor TRBP (TAR RNA binding protein; Homolog zum *loquacious* Genprodukt in *D. melanogaster*) ein ca. 18 bis 24 Nukleotide langes doppelsträngiges RNA Molekül. Dieses besitzt an seinen 3'-Enden jeweils einen zwei Nukleotide langen Überhang, ähnlich zu siRNA Molekülen, welche im Prozess der RNA Interferenz (RNAi) die Hauptrolle einnehmen. In der Regel bleibt der Strang dieser Duplex, dessen 5'-Terminus am thermodynamisch weniger stabilen Ende des RNA-Doppelstranges liegt, stabil und fungiert im Anschluss als mature, funktionelle miRNA, während der Gegenstrang abgebaut wird (Tomari et al. 2004). Alternativ können beide Arme

der Duplex als funktionelle miRNA erhalten bleiben, wobei dann meist ein Strang das Hauptprodukt (major species) und der andere Strang das Nebenprodukt (minor species, miRNA*) bildet (Bushati et al. 2007; Rana 2007; Du und Zamore 2005; Peters und Meister 2007).

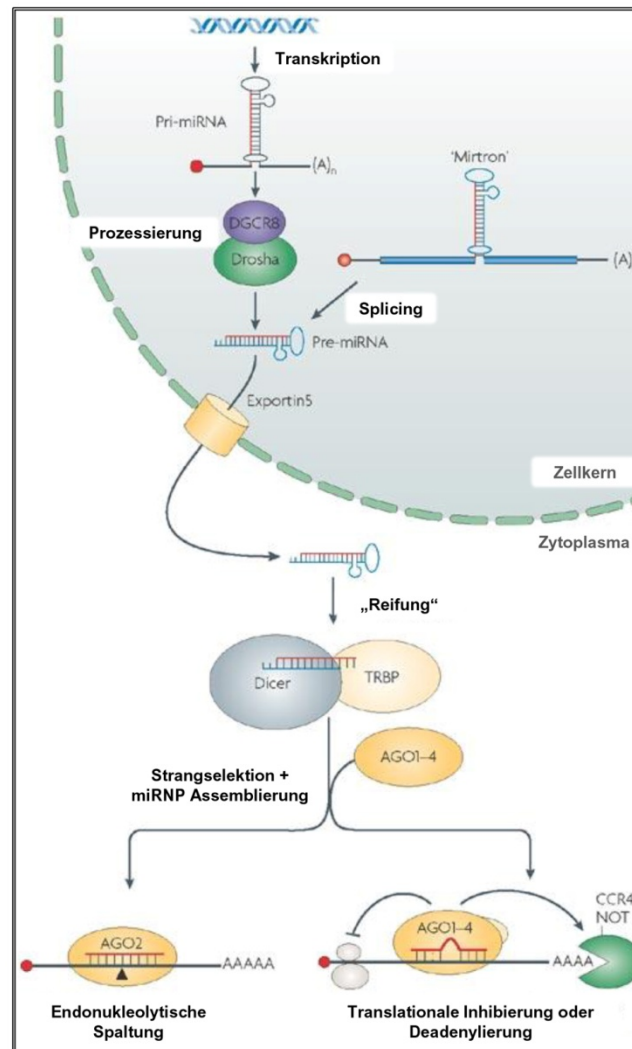


Abbildung 1-6: Schematische Darstellung der Biogenese und Funktionsweise von miRNAs (nach Filipowicz et al. 2008, modifiziert).

Die mature miRNA wird in einen als miRNP (micro-Ribonucleoprotein) oder miRISC (miRNA induced silencing complex) bezeichneten Multi-Enzymkomplex eingebaut. Dabei stellt die Assemblierung dieses Komplexes einen dynamischen Prozess dar, welcher eng mit der pre-miR Prozessierung durch Dicer gekoppelt ist (Bushati et al. 2007; Rana 2007; Du und Zamore 2005; Peters und Meister 2007). Die Kernkomponenten des miRNP Komplexes bilden Proteine der Argonaute (AGO) Familie. Sie sind die wichtigsten und auch die bisher bestcharakterisierten Bestandteile des miRNP Komplexes (Peters und Meister 2007; Tolia und Joshua-Tor 2007). Säugetiere besitzen vier AGO Proteine (AGO1 bis AGO4), wobei alle vier AGOs am miRNA vermittelten Gensilencing beteiligt sind, jedoch nur eines davon

(AGO2) in den Mechanismus der RNA Interferenz involviert ist. Eine Begründung hierfür findet sich in der Funktionsweise des AGO2 Proteins. Als einziges der AGO Proteine kann es mit seiner RNaseH ähnlichen PIWI (P-element induced wimpy testis) Domäne einen mRNA Strang in der Mitte einer siRNA-mRNA Duplex spalten, was den anderen AGO Proteinen nicht möglich ist. Im Gegensatz zu *D. melanogaster*, in welcher eine strikte Zuordnung der einzelnen Argonaute Proteine zu entweder miRNA vermitteltem Gensilencing (Argonaute1) oder siRNA vermittelter RNA Interferenz (Argonaute2) herrscht (Peters und Meister 2007; Tolia und Joshua-Tor 2007), liegt in Säugetieren also keine klare Trennung der Bestandteile des jeweils benötigten RISC Komplexes vor. Neben den AGO Proteinen können diverse weitere Proteine, z.B. RNA bindende Proteine wie FMRP (Eragile X mental retardation protein) oder Komponenten von P-bodies, wie GW182 oder RCK/p54, am Aufbau des miRNP Komplexes beteiligt sein, wobei ihre genauen Funktionen hierbei bisher nicht im Detail geklärt sind (Sontheimer 2005; Filipowicz et al. 2005; Peters und Meister 2007; Behm-Ansmant et al. 2006; Jakymiw et al. 2005; Chu und Rana 2006).

1.12.2 Grundlagen der Interaktion zwischen miRNA und Ziel-mRNA

Die Interaktion der in einem miRNP Komplex eingelagerten miRNA mit ihrer Ziel-mRNA erfolgt über Basenpaarung. In Pflanzen binden miRNAs dabei mit perfekter, oder zumindest annähernd perfekter, Komplementarität an ihre Target-Sequenzen. Dadurch kommt es zum Abbau der Ziel-mRNA durch einen RNAi-ähnlichen Mechanismus, wobei die mRNA endonukleolytisch im Zentrum der miRNA-mRNA Duplex gespalten wird (Jones-Rhoades et al. 2006). Hierbei liegen die Target-Sequenzen meist in der proteinkodierenden Region der Ziel-mRNA. In Metazoen gibt es deutliche Unterschiede zu diesem Mechanismus. Meist binden die miRNAs hier mit nur imperfekter Komplementarität an ihre Target-Sequenzen, welche außerdem meist im 3' nicht-translatierten Bereich (3'UTR, 3' untranslated region) der Ziel-mRNA liegen (Doench und Sharp 2004; Brennecke et al. 2005; Lewis et al. 2005; Grimson et al. 2007; Nielsen et al. 2007). Die Regeln, welche der Interaktion von miRNA und korrelierter Ziel-mRNA bei dieser imperfekten Basenpaarung zugrunde liegen, konnten bisher nur unvollständig durch experimentelle und bioinformatische Ansätze bestimmt werden und sind in Abbildung 1-7 graphisch zusammengefasst.

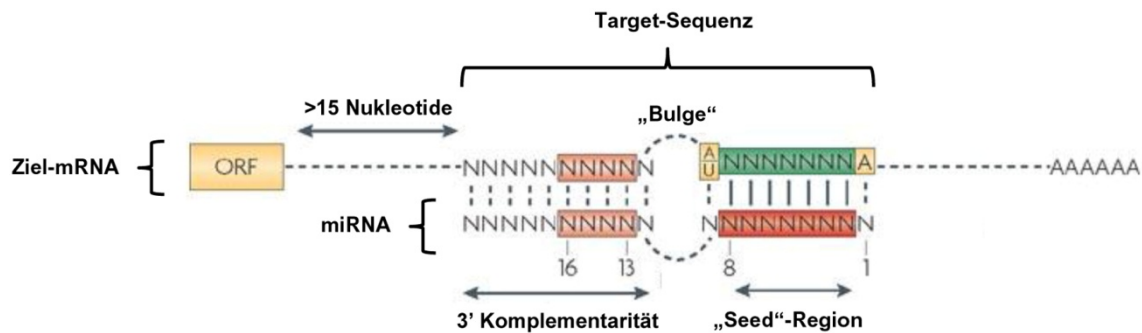


Abbildung 1-7: Schematische Darstellung der miRNA Bindung an die Ziel-mRNA (nach Filipowicz et al. 2008, modifiziert).

Absolut notwendige Voraussetzung für die miRNA-mRNA Interaktion ist eine perfekte Komplementarität beider RNA Stränge innerhalb der sogenannten „seed“-Sequenz. Hiermit werden die Nukleotide 2 bis 8 am 5'-Terminus der miRNA, sowie die zugehörigen Nukleotide der Target-Sequenz in der 3'UTR der Ziel-mRNA bezeichnet. Guanin-Urazil (GU) Paarungen, „mismatches“ (Fehlpaarungen einzelner Nukleotide) und die Bildung von „Blasen“ in der RNA-Doppelhelix (sogenannte Bulges) im Bereich der „seed“-Sequenz üben einen stark störenden Einfluss auf die miRNA-mRNA Interaktion aus. Dahingegen erhöhen ein Adenin an Position 1 und ein Adenin oder Urazil an Position 9 der Target-Sequenz der Ziel-mRNA die Effizienz der Bindung, wobei diese Nukleotide nicht notwendigerweise mit komplementären Nukleotiden der miRNA paaren müssen.

Zweite Voraussetzung ist das Vorhandensein diverser mismatches bzw. die Bildung einer „Blase“ in der zentralen Region der miRNA-mRNA Duplex, vermutlich um die AGO vermittelte endonukleolytische Spaltung der mRNA zu ermöglichen.

Eine dritte Regel besagt, dass ein „definiertes Maß“ an Komplementarität der Target-Sequenz in der Ziel-mRNA zur 3' Hälfte der miRNA gegeben sein muss, um die Bindung zu stabilisieren. Dabei werden mismatches und „Blasen“ in dieser Region toleriert, wobei eine stabile Basenpaarung, vor allem im Bereich der Nukleotide 13 bis 16 der miRNA, besonders wichtig ist, wenn die Komplementarität innerhalb der „seed“-Sequenz nur eingeschränkt gegeben ist (Brennecke et al. 2005; Grimson et al. 2007).

Zusätzlich sind diverse weitere Faktoren bekannt, welche Einfluss auf die Stabilität und somit auf die Effizienz der Bindung der miRNA an die Ziel-mRNA haben. Zum einen kann eine Target-Sequenz umso effektiver gebunden werden, je näher sie entweder am Terminations-Codon oder aber am poly-A Schwanz liegt bzw. umso AU-reicher ihre Umgebung ist. Dadurch bildet die entsprechende 3'UTR Region weniger Sekundärstrukturen aus, was sie zugänglicher für den miRNA-miRNP Komplex macht (Grimson et al. 2007; Nielsen et al. 2007; Gaidatzis et al. 2007; Kertesz et al. 2007). Zum anderen sind Beispiele für die Bindung einer miRNA an ihre Ziel-mRNA bekannt, welche gegen eine oder mehrere der postulierten Regeln verstoßen. So kann bei einigen miRNA-mRNA Interaktionen für eine effektive

Inhibierung der Translation sogar eine „Blase“ in der seed-Region erforderlich sein (Vella et al. 2004; Reinhart et al. 2000). Die ausgeprägte Variabilität bei der Basenpaarung zwischen miRNA und mRNA ist auch die Ursache für die vielseitige Funktion dieser Molekülklasse. So kann in Metazoen jede einzelne miRNA die Expression von mehreren Dutzend bis hin zu hunderten von Ziel-RNAs regulieren, während in den *Plantae*, in welchen miRNAs mit annähernd vollständiger Komplementarität zu ihren Target-Sequenzen vorliegen, je nur eine definierte, kleine Anzahl von Zielgenen besitzen (Lim et al. 2005).

Oftmals liegen Target-Sequenzen in der 3'UTR der Ziel-mRNA in mehreren Kopien vor. In diesem Fall ist das Vorhandensein von mehr als einer Bindestelle Voraussetzung für eine effiziente Reprimierung der mRNA Expression (Doench und Sharp 2004; Brennecke et al. 2005; Lewis et al. 2005; Grimson et al. 2007; Nielsen et al. 2007). Es muss sich dabei nicht gezwungenermaßen um mehrere Kopien der Target-Sequenz für ein und dieselbe miRNA handeln, es können auch Bindestellen für mehrere unterschiedliche, funktionell verknüpfte miRNAs vorliegen (sogenannte „target hubs“). Liegen die Target-Sequenzen in unmittelbarer Nähe zueinander (durch ca. 10 bis 40 Nukleotide getrennt), können sie kooperativ wirken. Das heißt, der zu beobachtende reprimierende Effekt übersteigt den aufgrund der Einzelbeiträge der Bindestellen erwarteten Wert (Doench und Sharp 2004; Grimson et al. 2007). Hierbei kann eine definierte Konfiguration der einzelnen Bindestellen notwendig sein, z.B. eine Trennung der Target-Sequenzen durch eine Nukleotid-Abfolge definierter Länge und Sequenz (Vella et al. 2004).

Durch Experimente, in deren Rahmen Target-Sequenzen für eine miRNA in die 5'UTR oder in proteinkodierende Bereiche eines Reporterplasmids eingeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass diese unabhängig von einer Lokalisation in der 3'UTR der Ziel-mRNA erkannt werden können und die Expression des Reportergens effizient reprimiert wird (Lytle et al. 2007; Kloosterman 2004; Easow et al. 2007). Allerdings fehlt bisher ein Beweis für die physiologische Bedeutung dieser Beobachtungen.

1.12.3 Mechanismen der miRNA vermittelten Inhibition der mRNA Expression

Nach Bindung des miRNA-miRNP Komplexes an die Ziel-mRNA kann deren weitere Prozessierung zu einem funktionellen Protein mittels verschiedener Mechanismen unterbunden werden (siehe Abbildung 1-8). Zum einen kann die Ziel-mRNA nach erfolgter Deadenylierung (Entfernung des 3'-terminalen Poly-A Schwanzes) und anschließend „Decapping“ (Entfernen der 5'-terminalen 7-Methylguanosin Kappe) exonukleolytisch abgebaut werden. Zum anderen kann eine Inhibierung der Translation erfolgen, wobei diese auf Ebene der Initiation oder der Elongation stattfinden kann. Desweiteren wurde ein durch

den miRNA-miRNP Komplex vermittelter proteolytischer Abbau der, bei der Translation der mRNA entstehenden, naszenten Polypeptide in Betracht gezogen (Nottrott et al. 2006). Letztere Hypothese konnte sich bisher nicht durchsetzen, da bis dato keine Protease identifiziert werden konnte, die an diesem proteolytischen Abbau beteiligt sein könnte. Im Folgenden wird daher lediglich auf erstere beiden, experimentell gut untersuchten Mechanismen eingegangen.

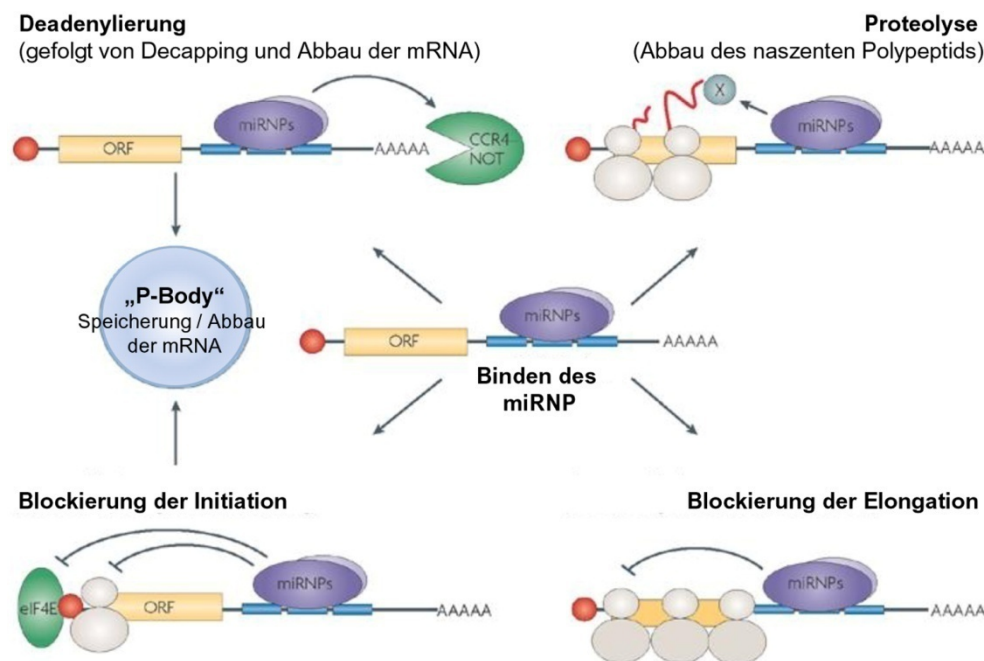


Abbildung 1-8: Übersicht über die Mechanismen, mittels welcher miRNAs die Prozessierung von Ziel-mRNAs verhindern (nach Filipowicz et al. 2008, modifiziert).

In vielen, wenn auch bei weitem nicht allen, Fällen beruht die durch miRNA vermittelte Repression einer mRNA auf deren Destabilisierung (Wu et al. 2006; Bagga et al. 2005; Behm-Ansmant et al. 2006; Giraldez et al. 2006; Wu und Belasco 2005). In Eukaryoten wird mRNA auf zwei verschiedene Wege abgebaut, an deren Anfang stets eine graduelle Verkürzung des 3' Poly-A Schwanzes steht. Dabei kann der RNA-Strang im Anschluss zum einen weiter progressiv in 3' → 5' Richtung exonukleolytisch abgebaut werden, was durch das Exosom katalysiert wird. Zum anderen kann nach der Deadenylierung ein als Decapping bezeichnetes Entfernen der 5'-terminalen 7-Methylguanosin Kappe erfolgen, woraufhin ein durch die Exonuklease XRN1 katalysierter Abbau der mRNA in 5' → 3' Richtung stattfindet (Parker und Song 2004). Es wird vermutet, dass zumindest die finalen Schritte des mRNA Abbaus in beiden Fällen in den sogenannten P-bodies stattfinden. Dies sind zelluläre Strukturen, welche mRNA katabolisierende Enzyme und translationale Inhibitoren in hoher Konzentration enthalten (Eulalio et al. 2007; Parker und Sheth 2007).

Aktuell sind die detailliertesten Informationen über den Mechanismus, der zur miRNA vermittelten Destabilisierung von mRNAs führt, für das Modellsystem *D. melanogaster* verfügbar. Hier wurde das P-body Protein GW182 (Produkt des *gawky* Gens) als Schlüsselmolekül für die Markierung von mRNAs zum Abbau bestimmt (Behm-Ansmant et al. 2006). Für diese Funktion sind die AGO PIWI Domäne des miRNPs Argonaute1, mit welchem GW182 interagiert, sowie die Glycin-Tryptophan (GW) Dipeptid-haltigen Domänen von GW182 selbst, ausschlaggebend (Behm-Ansmant et al. 2006; Till et al. 2007). Sowohl die Abwesenheit von GW182, als auch von Argonaute1 führen zu einer Akkumulation von mRNAs, welche für den miRNA vermittelten Abbau vorgesehen sind. Wird GW182 direkt an eine mRNA gebunden, wird diese auch in Abwesenheit von Argonaute1 abgebaut, was für eine nachgeschaltete Funktion von GW182 spricht. Werden Bestandteile des CCR4-NOT Deadenylierungsapparates ausgeschaltet, kann GW182 den mRNA Abbau nicht einleiten. Die Aufgabe von GW182 könnte somit die Rekrutierung des CCR4-NOT Komplexes an die abzubauen mRNA darstellen. Weiterhin können Knockdowns der Decapping-Komplex Proteine DCP1 und DCP2 den mRNA Abbau vermeiden, führen jedoch zu einer Akkumulation deadenylierter mRNAs (Behm-Ansmant et al. 2006; Eulalio et al. 2007). In ihrer Summe weisen diese Ergebnisse auf einen zeitlichen Ablauf hin, bei welchem Argonaute1 für die Vermittlung der Bindung von GW182 an die Ziel-mRNA verantwortlich zeichnet. Daraufhin ist GW182 für die Rekrutierung des CCR4-NOT Deadenylierungskomplexes zuständig, wobei im Anschluss an die Deadenylierung der mRNA das Entfernen der 5'-terminalen 7-Methylguanosin Kappe durch den Decapping-Komplex mit DCP1 und DCP2 erfolgt. Im Folgenden könnte dann der vollständige Abbau der mRNA durch XRN1 in 5' → 3' Richtung katalysiert werden. Obwohl zur Identifizierung dieses Mechanismus in Säugetieren weit weniger Daten vorliegen, konnte zumindest die in *D. melanogaster* beobachtete Interaktion von GW182 mit dem miRNP Argonaute1 auch für die Säugetier-Homologe dieser Moleküle bestätigt werden (Liu et al. 2005; Jakymiw et al. 2005; Meister et al. 2005). Desweiteren sprechen die Analysen von Zwischenprodukten des Abbaus reprimierter mRNAs in Säugetierzellen für einen 5' → 3' exonukleolytischen Abbau nach Decapping der Ziel-mRNA (Wu et al. 2006; Schmitter et al. 2006).

Wie bereits erwähnt, wird die Expression vieler miRNA Zielgene aber auch reprimiert, ohne eine Auswirkung auf die Kopienzahl der korrelierten mRNA feststellen zu können. Hierbei kommt es zu einer Blockade der Translation durch den miRNA-miRNP Komplex, ohne dabei eine Destabilisierung der mRNA hervorzurufen. Da diese Inhibierung der Translation vermutlich auf Ebene der Translationsinitiation stattfindet, soll im Folgenden kurz auf die Mechanismen, welcher letzterer zugrunde liegen, eingegangen werden. Abbildung 1-9 zeigt eine vereinfachte Darstellung der Initiation der Translation in eukaryotischen Zellen. Dabei bindet im ersten Schritt die eIF4E Untereinheit des eukaryotischen Translations-

Initiationsfaktors (eIF) eIF4F die 5'-terminale 7-Methylguanosin Kappe der mRNA. Der Multidomänenkomplex eIF4F enthält weiterhin auch die Untereinheit eIF4A (eine RNA Helikase) sowie die Untereinheit eIF4G, welche zusammen mit einem weiteren Initiationsfaktor, eIF3, für die Rekrutierung der 40S ribosomalen Untereinheit verantwortlich ist (Merrick 2004; Kapp und Lorsch 2004). Im Folgenden beginnt der so aus mindestens 10 Initiationsfaktoren und der 40S ribosomalen Untereinheit entstandene Initiationskomplex die 5'UTR der mRNA auf der Suche nach dem AUG Startkodon abzufahren („ribosomal scanning“). Anschließend erfolgt die Anlagerung der 60S ribosomalen Untereinheit. Hierbei spielt der eukaryotische Translations-Elongationsfaktor (eEF) 6, welcher bereits in die Biogenese der 60S ribosomalen Untereinheit involviert ist, eine wichtige Rolle (Russell und Spremulli 1978; Sanvito et al. 1999; Si und Maitra 1999; Basu et al. 2001). Vermutlich ermöglicht erst sein Ablösen von der 60S Untereinheit deren Anlagerung an den Initiationskomplex, während in seiner Anwesenheit keine Anlagerung erfolgen kann. Ist die Bildung des Translationskomplexes abgeschlossen, beginnt die Elongationsphase. Diese kann unter anderem durch Phosphorylierung des Elongationsfaktors eEF2 reguliert werden. Eine weitere wichtige Rolle im Rahmen der Elongationsphase nimmt der bereits zuvor besprochene Initiationsfaktor eIF4G ein, da er zusätzlich mit dem Polyadenylat-bindenden Protein 1 (PABP1) interagieren kann. Auf diese Weise werden beide Enden der mRNA in unmittelbare Nachbarschaft zueinander gebracht (Wells et al. 1998; Derry et al. 2006). Diese Zirkularisierung der mRNA fördert nicht nur die Initiation der Translation durch Erhöhung der Affinität von eIF4E für die Bindung der 7-Methylguanosin Kappe, sondern ist möglicherweise auch dem sogenannten Ribosomen Recycling und somit einer effizienteren Translation zuträglich. Mit Erreichen eines Terminationskodons (UAA, UGA, UAG) endet die Elongationsphase und der Terminationsprozess, im Laufe dessen die ribosomalen Untereinheiten mittels sogenannter release-Faktoren von der mRNA abgelöst werden, wird eingeleitet.

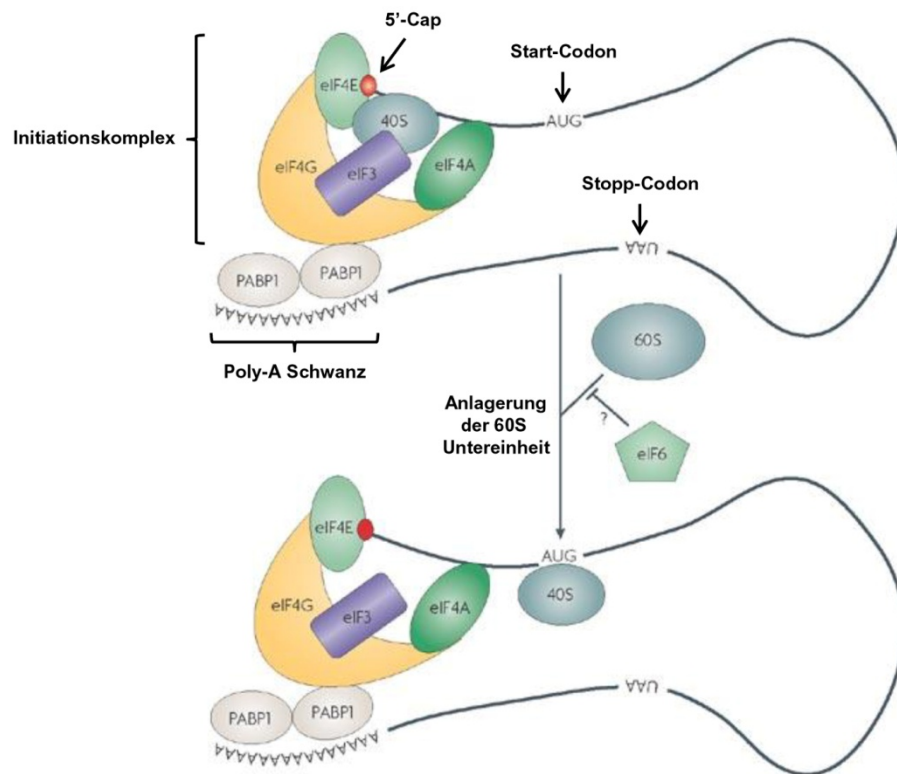


Abbildung 1-9: Vereinfachte Darstellung der Translations-Initiation in Eukaryonten (nach Filipowicz et al. 2008, modifiziert).

Aktuell wird aufgrund einer Fülle von experimentellen Daten ein Modell der miRNA vermittelten Inhibierung der Translation auf Ebene des Initiationsschrittes favorisiert (Filipowicz et al. 2008). Zum einen wurden Experimente mit Reporter-mRNAs, welche zusätzlich zu miRNA Target-Sequenzen in ihrer 3'UTR auch IRES (internal ribosomal entry sites; ermöglichen eine 7-Methylguanosin Kappen unabhängige Initiation der Translation) oder nicht-funktionellen ApppN Kappen (ein nicht methyliertes Analogon zur 7-Methylguanosin Kappe; wird nicht von eIF4E gebunden, wodurch die mRNA nur ineffizient translatiert wird) besitzen, durchgeführt. In beiden Fällen konnte die Translation der Reporter-mRNAs im Gegensatz zu Reporter-mRNAs mit einer normalen 7-Methylguanosin Kappe nicht durch die korrelierte miRNA unterbunden werden (Pillai et al. 2005; Humphreys et al. 2005). Dies, zusammen mit weiteren Experimenten, lässt das Vorhandensein einer 7-Methylguanosin Kappe als zwingende Voraussetzung für eine effektive miRNA vermittelte Inhibierung der Translation erscheinen. Zum anderen zeigten Reporter-mRNAs, welche über funktionelle miRNA Bindestellen verfügten, im Rahmen von Polysomen-Gradienten Analysen im Vergleich zu Reportern mit nicht-funktionellen Bindestellen einen starke Tendenz zur Sedimentation im oberen Teil des Gradienten. Dies lässt auf eine weniger starke Beladung der über miRNA Bindestellen verfügenden mRNAs mit Ribosomen schließen (Pillai et al. 2005). Weitere experimentelle Erkenntnisse in Bezug auf die Mitglieder der AGO Proteinfamilie legen die Vermutung nahe, dass diese mit niedriger Affinität an die 7-

Methylguanosin Kappe einer mRNA binden können und auf diese Weise die Initiation der Translation durch kompetitive Hemmung der Interaktion von eIF4E mit der Kappenstruktur inhibieren können (Chekulaeva et al. 2006; Richter und Sonenberg 2005; Cho et al. 2005; Kiriakidou et al. 2007; Marcotrigiano 1997). Im Gegensatz zum Vorhandensein einer 7-Methylguanosin Kappe, welches elementar für eine Inhibierung der Translation von Reporter-mRNAs scheint (Wang et al. 2006; Thermann und Hentze 2007; Mathonnet et al. 2007; Wakiyama et al. 2007), konnte gezeigt werden, dass ein 3' Poly-A Schwanz *per se* nicht als unabdingbare Voraussetzung für die miRNA vermittelte translationale Repression der Proteinproduktion gelten kann (Wu et al. 2006). Zusammengefasst weisen diese Ergebnisse auf einen Mechanismus hin, bei welchem die AGO Proteine des miRNA-miRNP Komplexes die Interaktion von eIF4E mit der 5'-terminalen 7-Methylguanosin Kappe der mRNA stören und somit die Bildung eines funktionell effektiven Initiationskomplexes verhindert wird.

Ein alternativer Mechanismus der miRNA vermittelten Inhibierung der Translation auf Ebene des Initiationsschrittes könnte durch Eingriffe in den Prozess der Anlagerung der 60S ribosomalen Untereinheit an den Initiationskomplex gegeben sein (Chendrimada et al. 2007). Sowohl eIF6 als auch die 60S ribosomale Untereinheit konnten zusammen mit dem AGO2-Dicer-TRBP Komplex ko-immunopräzipitiert werden. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass bei weitgehender Abwesenheit von eIF6 die Expression von miRNA regulierten Ziel-mRNAs nicht unterbunden werden kann. Dies könnte auf die fehlende eIF6 vermittelte Blockierung der Anlagerung der 60S ribosomalen Untereinheit zurückzuführen sein, was ein Zusammenspiel von miRNA-miRNP Komplex und eIF6 bei der Inhibierung des Initiations-Schrittes impliziert.

Trotz einer Fülle experimenteller Daten, welche auf eine miRNA vermittelte Inhibierung der Translation auf Ebene der Initiation hindeutet, ist es unwahrscheinlich, dass dies der einzige Mechanismus ist, durch welchen miRNAs die Proteinproduktion hemmen. Schon frühe Ko-Sedimentierungs-Studien in *C. elegans* zeigten, dass reprimierte mRNAs mit Polysomen verbunden bleiben, obwohl eine starke Reduktion ihrer Proteinprodukte auftrat (Olsen und Ambros 1999; Seggerson et al. 2002). Diese Beobachtungen konnten im humanen System bestätigt werden (Maroney et al. 2006). Hierbei wurde vermutet, dass miRNAs möglicherweise eine Verlangsamung der Translation hervorrufen können. Es bleibt bis dato allerdings unklar, wie eine derartige Hemmung der Elongationsphase durch miRNAs verursacht sein könnte. Es erscheint möglich, dass in allen Fällen miRNA vermittelter Inhibierung der Translation eine Hemmung des Initiations-Schrittes stattfindet und die Hemmung des Elongationsschrittes nur einen zusätzlichen, verstärkenden Mechanismus für die seltenen Fälle, in welchen es dennoch zur erfolgreichen Initiation kommt, darstellt (Filipowicz et al. 2008). In einem alternativen Modell könnte eine Entscheidung über die

Repression der Translation entweder auf Initiations- oder aber auf post-Initiations-Ebene von dem Promotor, unter dessen Kontrolle die mRNA exprimiert wird, abhängig sein (Kong et al. 2008; Cannell et al. 2008).

Sowohl für die miRNA vermittelte Inhibierung der mRNA Expression durch Destabilisierung der mRNA als auch durch Inhibierung der Translation gibt es folglich eine Fülle experimenteller Daten sowie Beispiele *in vitro* und *in vivo*. Anhand von *D. melanogaster* konnte gezeigt werden, dass einige endogene mRNAs bzw. artifizielle Reporter-mRNAs vollständig durch Inhibierung der Translation, andere vollständig durch Destabilisierung der mRNA und eine dritte Gruppe durch eine Kombination beider Effekte reprimiert werden (Behm-Ansmant et al. 2006; Eulalio et al. 2007). Es bleibt jedoch unklar, welche Determinanten das Schicksal einer mRNA in die eine oder andere Richtung leiten. In diesem Zusammenhang werden akzessorische, an die 3'UTR gebundene Proteine, sowie strukturelle Besonderheiten der imperfekten miRNA-mRNA Duplex, vor allem in deren zentraler Region, diskutiert (Schmitter et al. 2006; Aleman et al. 2007).

Weiterhin kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob es sich bei der Deadenylierung und dem anschließenden Abbau der mRNA um die Ursache oder um eine Auswirkung der Inhibierung der Translation handelt. Eine Störung der Interaktion von eIF4E mit der 7-Methylguanosin Kappe durch AGO würde nicht nur die Bildung des Initiationskomplexes, sondern auch die Zirkularisierung der mRNA verhindern, wodurch das 3' Poly-A Ende der mRNA zugänglicher für den exonukleolytischen Abbau werden könnte. Im Gegensatz zu dieser Hypothese stehen jedoch die Ergebnisse einiger Studien, welche eine Unabhängigkeit von Deadenylierung und Abbau von aktiver Translation nahelegen und somit auf die Deadenylierung als einen primären, nicht als einen nachgeschalteten, sekundären Mechanismus schließen lassen (Mishima et al. 2006; Wu et al. 2006; Giraldez et al. 2006; Eulalio et al. 2007).

1.12.4 miRNAs im malignen Melanom – Stand der Forschung zu Beginn dieser Arbeit

Betrachtet man die Jahreszahlen der in diesem Teil der Einleitung zitierten Artikel, stellt man fest, dass sie meist im Laufe der letzten zwei bis drei Jahre veröffentlicht wurden. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit im April 2006 waren die grundlegenden Vorgänge im Rahmen der Biogenese und Funktionsausübung von miRNAs zwar bereits bekannt, jedoch konnte die Forschung erst durch ihr Voranschreiten in jüngster Vergangenheit eine Verfeinerung dieser groben Skizze erzielen. Trotzdem sind wir auch aktuell von einem vollständigen Verständnis der, dem miRNA vermittelten Gensilencing zugrundeliegenden, molekularen Ereignisse weit entfernt – als Beispiel seien die rudimentären Kenntnisse über die Regeln für

die Interaktion von miRNA und mRNA oder aber über die molekularen Mechanismen bei der Inhibition der Translation genannt.

Relativ früh wurde im Rahmen grundlegender Analysen der miRNA basierten Genregulation festgestellt, dass die auf diese Weise regulierten Zielgene aus diversen Molekülklassen, wie der der Transkriptionsfaktoren, sekretierten Proteine, Rezeptoren und Transporter stammen können (z.B. Lim et al. 2005; Krek et al. 2005; John et al. 2004; Kiriakidou et al. 2004; Enright et al. 2003; Stark et al. 2003; Lewis et al. 2003). Dementsprechend konnte eine Beteiligung von miRNAs an der Regulation unterschiedlichster grundlegender zellulärer Prozesse, wie Proliferation, Differenzierung, Zell-Zyklus Regulation und Apoptose, sowie an spezialisierten Prozessen wie der Entwicklung des zentralen Nervensystems, der Insulin Sekretion, der Differenzierung von Adipozyten und B-Zellen bzw. der Herzentwicklung nachgewiesen werden (z.B. Lee et al. 2005; Johnson et al. 2005; Calin et al. 2004; Iorio et al. 2005; Brennecke et al. 2003; Chang et al. 2004; Chen et al. 2004; Zhao et al. 2005). Die Beteiligung der miRNAs an der Regulation von Genen derartig unterschiedlicher Funktion erscheint nicht verwunderlich, da die Gesamtzahl an miRNA Genen im menschlichen Genom auf ca. 1.000 und die Anzahl ihrer Ziel-mRNAs auf ca. 30% aller humanen Transkripte geschätzt wurde. Aktuell umfasst die Datenbank „microRNA.org“ (Betel et al. 2008) über 677 Einträge für humane miRNAs (im Jahr 2006 waren etwas mehr als 400 miRNA Sequenzen bekannt), was die ursprünglichen Schätzungen nicht unrealistisch erscheinen lässt.

Da eine Fehlregulation zellulärer Mechanismen, welche zu erhöhter Proliferation, fehlender Zell-Zyklus Kontrolle oder unterdrückter Differenzierung bzw. Apoptose von Zellen führt, die Grundlage von Krebserkrankungen bildet, wurde den miRNAs aufgrund ihrer weitreichenden Beteiligung an der Regulation derartiger Prozesse auch eine wesentliche Bedeutung bei Krebsentstehung und -progression zugesprochen. „A New Cancer Player Takes the Stage“ titelte das Magazin Science im November 2005. Anlass war das Erscheinen eines Artikel von Johnson et al. in welchem erstmals die Regulation des Ras Onkogens durch die miRNA let-7 im humanen System beschrieben wurde (Johnson et al. 2005). Dabei verknüpfte die Arbeitsgruppe um Frank Slack in Yale Erkenntnisse aus dessen früher miRNA Forschung in *C. elegans* mit dem Verlust der let-7 Expression in einem großen Kollektiv an Lungenkrebs Biopsien. Zusammen mit den Beobachtungen von Takamizawa und Kollegen, welche durch Überexpression von let-7 einen Proliferationsstopp in Lungenkrebszellen erreichen konnten (Takamizawa et al. 2004), konnte let-7 auf diese Weise als erster miRNA eine Funktion als Tumorsuppressor zugeordnet werden, da sie ein Onkogen reprimieren kann. Weiterhin akkumulierten diverse Studien über die Lokalisation von miRNA Genen in chromosomalen Bereichen, welche in Krebserkrankungen häufig Veränderungen unterliegen (Calin et al. 2004; Sonoki et al. 2005; Calin et al. 2002; Cimmino et al. 2005) sowie Veröffentlichungen, welche für Krebserkrankungen spezifische miRNA Expressionsmuster beschrieben

(Takamizawa et al. 2004; Iorio et al. 2005; Calin et al. 2005; Lu et al. 2005; Ciafre et al. 2005; Chan et al. 2005; He et al. 2005; O'Donnell et al. 2005; Calin et al. 2004).

Obwohl eine Beteiligung von miRNAs an der Entstehung und Progression diverser maligner Tumore damit in wissenschaftlichen Kreisen als anerkannt galt, hielten sich die Informationen über die Auswirkung von miRNAs auf die Tumorigenese des malignen Melanoms im speziellen zum damaligen Zeitpunkt in engen Grenzen. So enthielt die Studie von Lu et al. die Expressionsprofile von zwei Melanomzelllinien und drei Melanomgewebeproben, jedoch fehlten die Profile normaler humaner Melanozyten bzw. gesunder Haut um differenziell exprimierte miRNAs identifizieren zu können (Lu et al. 2005). Informationen über eine Fehlexpression oder die spezifische Funktion einzelner miRNAs in Melanomzellen waren nicht verfügbar.

2. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch die Analyse von microRNAs (miRNAs) in der Entstehung und Progression des malignen Melanoms zu einem besseren Verständnis der molekularen Mechanismen, welche dieser Erkrankung zugrunde liegen, beizutragen.

Da der Einfluss von miRNAs als Negativ-Regulatoren der Genexpression auf zelluläre Funktionen im Allgemeinen und auf die Tumorentstehung im Speziellen erst seit wenigen Jahren Gegenstand der Forschung ist, liegen bis heute auch für das maligne Melanom kaum detaillierte Daten vor. Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit die Beteiligung von miRNAs an verschiedenen Schritten der Tumorigenese des Melanoms untersucht werden. Hierzu wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt:

(A) Zum Ersten sollten bereits bekannte, Melanom-relevante Gene auf eine potenzielle Regulation durch miRNA vermitteltes, posttranskriptionelles „Silencing“ analysiert werden. Dabei war es Ziel, eine miRNA zu identifizieren, welche die Expression des wesentlich zum invasiven Potenzial von Melanomzellen beitragenden Moleküls Integrin beta3 reguliert. Weiterhin wurde der Nachweis einer direkten Interaktion der microRNA miR-196a mit Target-Sequenzen im Transkript des Homeobox-Proteins HOX-C8 angestrebt. Letzterem wurde ein regulatorischer Einfluss auf das Tumorsuppressor-Gen *Hugl-1*, dessen Expression im Melanom verloren ist, nachgesagt. Diese regulatorischen Zusammenhänge sollten nun im Detail analysiert werden.

(B) Zum Zweiten sollten „neue“ miRNAs identifiziert werden, welche in Melanomzellen im Vergleich zu normalen humanen Melanozyten stark differenziell reguliert werden und somit wesentlich zur Entstehung und Progression des malignen Melanoms beitragen könnten. Hierzu sollten miRNA Expressionsprofile von normalen humanen Melanozyten und etablierten Melanomzelllinien erstellt und gegeneinander abgeglichen werden.

3. Ergebnisse

3.1 Regulation der Integrin beta3 Expression durch die miRNA let-7a

Wie in Punkt 1.8.2.1 erwähnt, wurde in der Vergangenheit bereits gezeigt, dass das Molekül Integrin beta3 in Melanomzellen im Vergleich zu normalen humanen epidermalen Melanozyten (NHEMs) stark überexprimiert vorliegt und eng mit einem invasiven bzw. metastatischen Phänotyp assoziiert ist (Johnson 1999; Hsu et al. 1998). Dennoch war über die Regulation der Integrin beta3 Expression in Tumorzellen im Allgemeinen und im malignen Melanom im Speziellen nur wenig bekannt (Jin et al. 1998; Woods et al. 2001). Versuche, welche in unserer Arbeitsgruppe vor Beginn dieser Dissertation durchgeführt worden waren, zeigten, dass die bisher in der Literatur beschriebenen Mechanismen nicht auf unsere Melanomzelllinien übertragbar waren. Vor allem Experimente mit Reportergen-Konstrukten ließen Zweifel an einer zuvor beschriebenen Regulation der Integrin beta3 Expression auf transkriptioneller Ebene aufkommen und wiesen auf einen posttranskriptionellen Mechanismus hin. Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun geklärt werden, ob eine Regulation der Integrin beta3 Expression auf transkriptioneller Ebene ausgeschlossen werden kann und inwiefern eine Regulation auf posttranskriptioneller Ebene, durch miRNA induziertes Silencing der Genexpression mittels RNA Interferenz, vorliegen könnte.

3.1.1 Analyse der Integrin beta3 Expression in Melanozyten und Melanomzelllinien

Die in der Literatur beschriebene Fehlregulation der Expression des Integrins beta3 konnte durch quantitative real-time PCR (qRT-PCR) und Western Blot Experimente in acht Melanomzelllinien (4 Zelllinien aus Primärtumoren, 4 Zelllinien aus Melanom-Metastasen) sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene bestätigt werden. Abbildung 3-1 zeigt das stark erhöhte Integrin beta3 Expressionsniveau in den Melanomzelllinien im Vergleich zu einem Melanozyten-„Pool“ (aufgrund der Heterogenität von Melanozyten wurden für die Experimente jeweils RNA-Isolate bzw. Protein-Lysate aus zwei unterschiedlichen Melanozyten-Chargen vereint; dies wurde als Melanozyten-Pool bezeichnet). Auf RNA-Ebene war dabei eine 8 bis annähernd 50-fach gesteigerte Integrin beta3 Expression in den Melanomzelllinien zu beobachten (Abb. 3-1 A). Diese Ergebnisse konnten auf Protein-Ebene im Western Blot mit einem spezifischen anti-Integrin beta3 Antikörper verifiziert werden. Hierbei konnten starke Banden in den Spuren mit Proteinlysaten aus Melanomzelllinien

detektiert werden, während in der Spur mit Proteinlysate aus einem Melanozyten-Pool kein Integrin beta3 detektiert werden konnte (Abb. 3-1 B).

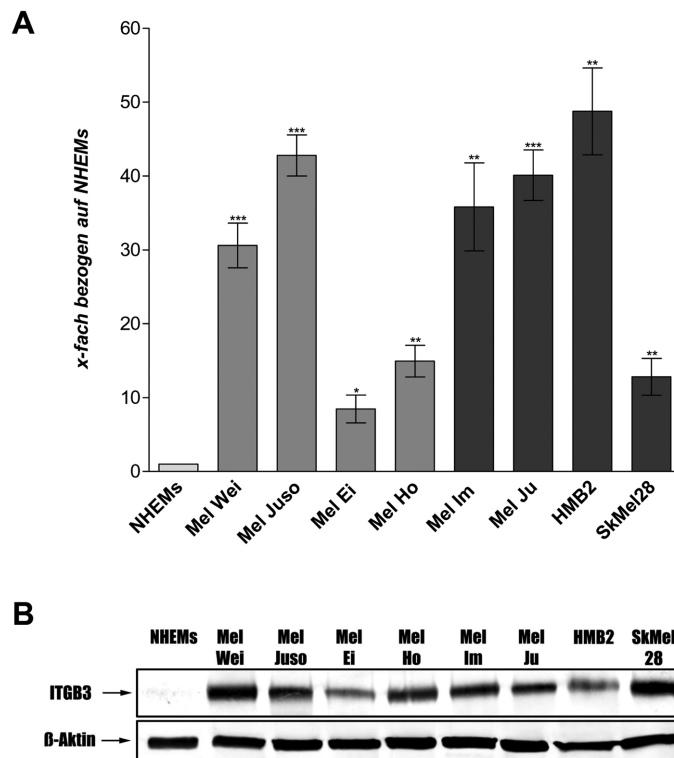


Abbildung 3-1: Integrin beta3 Expression in Melanozyten und Melanomzelllinien. (A) Die acht getesteten Melanomzelllinien zeigten auf mRNA-Ebene eine um 8 bis 50fach erhöhte Integrin beta3 Expression im Vergleich zu normalen humanen epidermalen Melanozyten (NHEMs; qRT-PCR). Melanomzelllinien aus Primärtumoren sind durch hellgraue, metastatische Zelllinien durch dunkelgraue Balken gekennzeichnet. **(B)** Auch auf Protein-Ebene zeigten die Melanomzelllinien eine starke Integrin beta3 Expression, während in Melanozyten kaum Integrin beta3 detektiert werden konnte (Western Blot).

Die Integrin beta3 Expression wurde auch in unserem melanozytären Modellsystem (siehe Punkt 1.9) untersucht. Aus Antikörper- und cDNA-Array Experimenten war bereits bekannt, dass die MIA-defizienten Zellklone bezüglich der Integrin beta3 Expression dem melanozytären Phänotyp entsprachen (Poser et al. 2004; Tatzel et al. 2005). Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit sowohl durch qRT-PCR als auch durch Western Blotting bestätigt werden. Abbildung 3-2 zeigt den beinahe vollständigen Verlust der Integrin beta3 Expression in den MIA-defizienten Zellklonen HMB2-MIA5 und HMB2-MIA8 im Vergleich zur parentalen Melanomzelllinie HMB2 und dem Kontrol-Klon HMB2/lacZ.

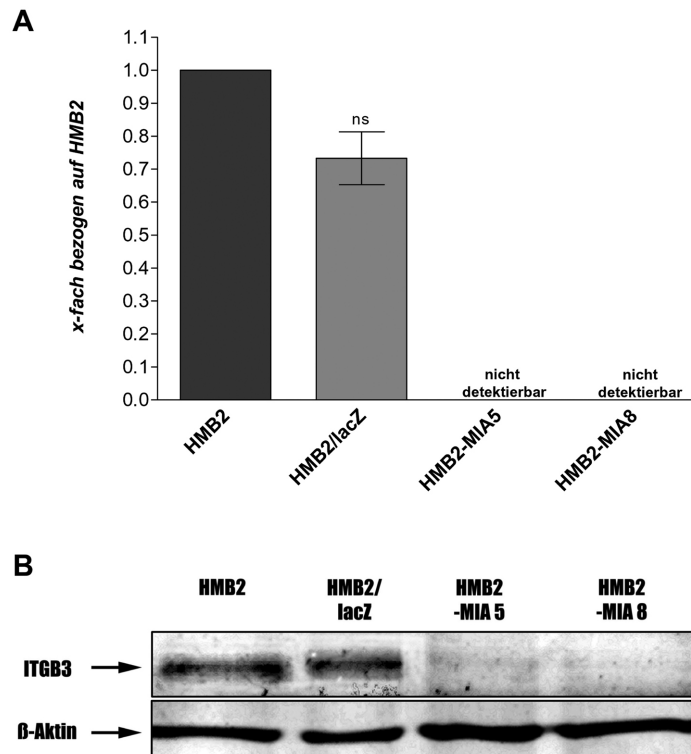


Abbildung 3-2: Integrin beta3 Expression im melanozytären Modellsystem. (A) Im Gegensatz zur parentalen Melanomzelllinie HMB2 sowie dem Kontroll-Klon HMB2/lacZ zeigten die MIA-defizienten Zellklone HMB2-MIA5 und HMB2-MIA8 auf mRNA-Ebene keine detektierbare Integrin beta3 Expression (qRT-PCR). **(B)** Auch auf Protein-Ebene konnte in den MIA-defizienten Zellklonen kaum Integrin beta3 nachgewiesen werden, während die parentale Zelllinie HMB2 sowie der korrelierte Kontroll-Klon HMB2/lacZ starke Signale mit dem anti-Integrin beta3 Antikörper zeigten (Western Blot).

Aufgrund der Übereinstimmung des Integrin beta3 Expressionsmusters konnten die MIA-defizienten Zellklone in den weiteren Versuchen zusätzlich zu Melanozyten eingesetzt werden. In Anbetracht der geringen Zelldichten und des langsamen Wachstums von Melanozyten, sowie der geringen erreichbaren Transfektionseffizienz bei diesem Zelltyp, bietet die Nutzung des HMB2/HMB2-MIA Zellsystems wesentliche Vorteile. Zum einen stehen ausreichend hohe Zellzahlen für Experimente zur Verfügung, zum anderen lassen sich die MIA-defizienten Zellklone auch unter Verwendung herkömmlicher Methoden mit hoher Effizienz transfizieren.

3.1.2 Analyse der Integrin beta3 Promotoraktivität im melanozytären Modellsystem

Jin et al. beschrieben in ihrer Veröffentlichung 1998 eine Promotor-abhängige Regulation der Integrin beta3 Expression auch in der Melanomzelllinie WM793 (Jin et al. 1998). Dabei setzten sie Reporter-gen-Konstrukte ein, welche unterschiedlich lange Fragmente der Integrin

beta3 Promotor-Sequenz enthielten. Um eine mögliche Promotor-vermittelte Regulation der Integrin beta3 Expression in Melanomzellen eingehender zu untersuchen, wurden zwei dieser Reportergen-Konstrukte (ITGB3_Promoter_1159 und ITGB3_Promoter_146, siehe 5.1.5) transient in den MIA-defizienten Zellklon HMB2-MIA5 und die parentale Melanomzelllinie HMB2 transfiziert. Beide Konstrukte ließen eine leicht verminderte Aktivität des Integrin beta3 Promotors in dem MIA-defizienten Zellklon im Vergleich zu parentalen HMB2 Zellen erkennen (Abbildung 3-3). Jedoch blieb auch in den HMB2-MIA5 Zellen eine starke Promotor-Aktivität im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen, welche den pGL3 basic Vektor als Leervektor ohne Insert erhalten hatten, festzustellen.

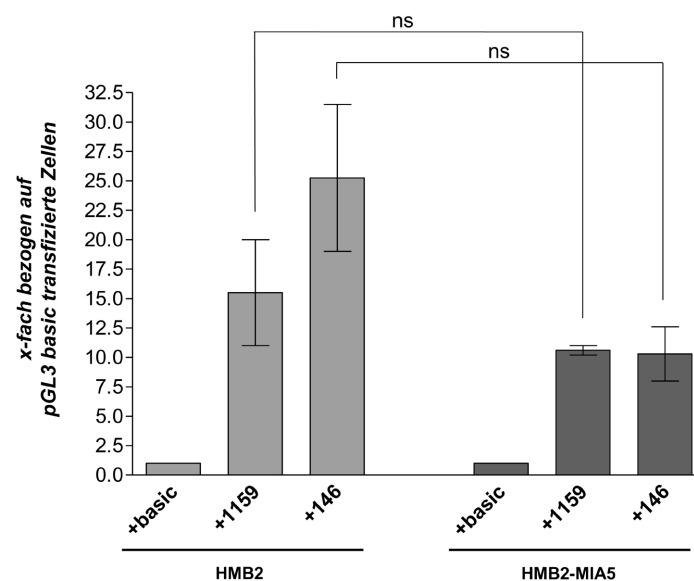


Abbildung 3-3: Aktivität des Integrin beta3 Promotors im melanozytären Modellsystem.

Zwei in ihrer Länge differierende Integrin beta3 Promotor Reportergen-Konstrukte (ITGB3_Promoter_1159 und ITGB3_Promoter_146, siehe 5.1.5) wurden in den MIA-defizienten Zellklon HMB2-MIA5 (rechter Teil des Graphen) bzw. in parentale HMB2 Zellen (linker Teil des Graphen) eingebracht. Auch in den HMB2-MIA5 Zellen zeigte der Integrin beta3 Promotor hohe Aktivität, wenngleich diese etwas vermindert im Vergleich zu parentalen HMB2 Zellen war (Luziferase-Assay).

Die Stärke der zu beobachtenden Promotor-Aktivität stand dabei im Gegensatz zu der Tatsache, dass in den MIA-defizienten Zellklone sowohl auf RNA als auch auf Protein-Ebene kaum eine Integrin beta3 Expression detektiert werden konnte (siehe 3.1.1). Dies legte die Vermutung nahe, dass Promotor-abhängige Mechanismen bei der Regulation der Integrin beta3 Expression zwar eine Rolle spielen können, die grundlegende Regulation in Form einer „Ja/Nein“-Entscheidung jedoch auf posttranskriptioneller Ebene stattfindet.

3.1.3 Identifikation der miRNA let-7a als potenzieller Regulator der Integrin beta3 Expression

Da im Rahmen der vorangegangenen Experimente eine Regulation der Integrin beta3 Expression auf posttranskriptioneller Ebene festgestellt werden konnte, sollte nun geprüft werden, ob diese durch miRNA induziertes Gensilencing erfolgt. Unter Verwendung der Algorithmen miRanda (John et al. 2005), TargetScan S (Lewis et al. 2005) und PicTar-Vert (Krek et al. 2005) zur Vorhersage von Interaktionen mit miRNAs wurde die Integrin beta3 3'UTR auf Bindestellen für potentiell regulierende microRNAs untersucht. Tabelle 3-1 zeigt eine Zusammenfassung dieser Auswertung.

Name der miRNA	vorhergesagt durch
<i>hsa-miR-30</i>	TargetScan S, PicTar-Vert
<i>hsa-let-7a</i>	TargetScan S, miRanda
<i>hsa-miR-202</i>	miRanda
<i>hsa-miR-290</i>	miRanda
<i>hsa-miR-125</i>	TargetScan S
<i>hsa-miR-98</i>	TargetScan S

Tabelle 3-1: miRNAs, welche im Rahmen einer *in silico* Analyse für eine potentielle Interaktion mit der Integrin beta3 3'UTR vorhergesagt wurden. Während zwei der miRNAs von mehr als einem der verwendeten Algorithmen vorgeschlagen wurden, handelte es sich bei den weiteren Kandidaten um Einfachnennungen (*hsa: homo sapiens*).

Da miRNAs eine Funktion als Negativ-Regulatoren der Genexpression ausüben, musste eine potentiell regulatorische miRNA ein zur Integrin beta3 Expression reziprokes Expressionsmuster aufweisen. Für eine der vorhergesagten miRNAs, let-7a, konnte dies in qRT-PCR Experimenten bestätigt werden. Abbildung 3-4 A zeigt den beinahe vollständigen Verlust der let-7a Expression in den untersuchten Melanomzelllinien. Um zu demonstrieren, dass diese Situation auch *in vivo* besteht und nicht lediglich ein Zellkultur-Artefakt darstellt, wurde die let-7a Expression zusätzlich auch in vier Gewebeproben aus Melanom Primärtumoren analysiert. Sie zeigte ein übereinstimmendes Bild, wobei in nur einer Probe let-7a überhaupt nachgewiesen werden konnte, während in den anderen Gewebeproben kein let-7a detektierbar war (Abb. 3-4 B).

Die Analyse der let-7a Expression in unserem melanozytären Modellsystem zeigte ebenfalls eine inverse Korrelation des let-7a Expressionsmusters mit der zuvor gezeigten Integrin beta3 Expression. Hierbei ist in den MIA-defizienten Zellklonen, welche keine Integrin beta3 Expression mehr zeigen, eine starke Re-Expression von let-7a zu erkennen (Abb. 3-4 C).

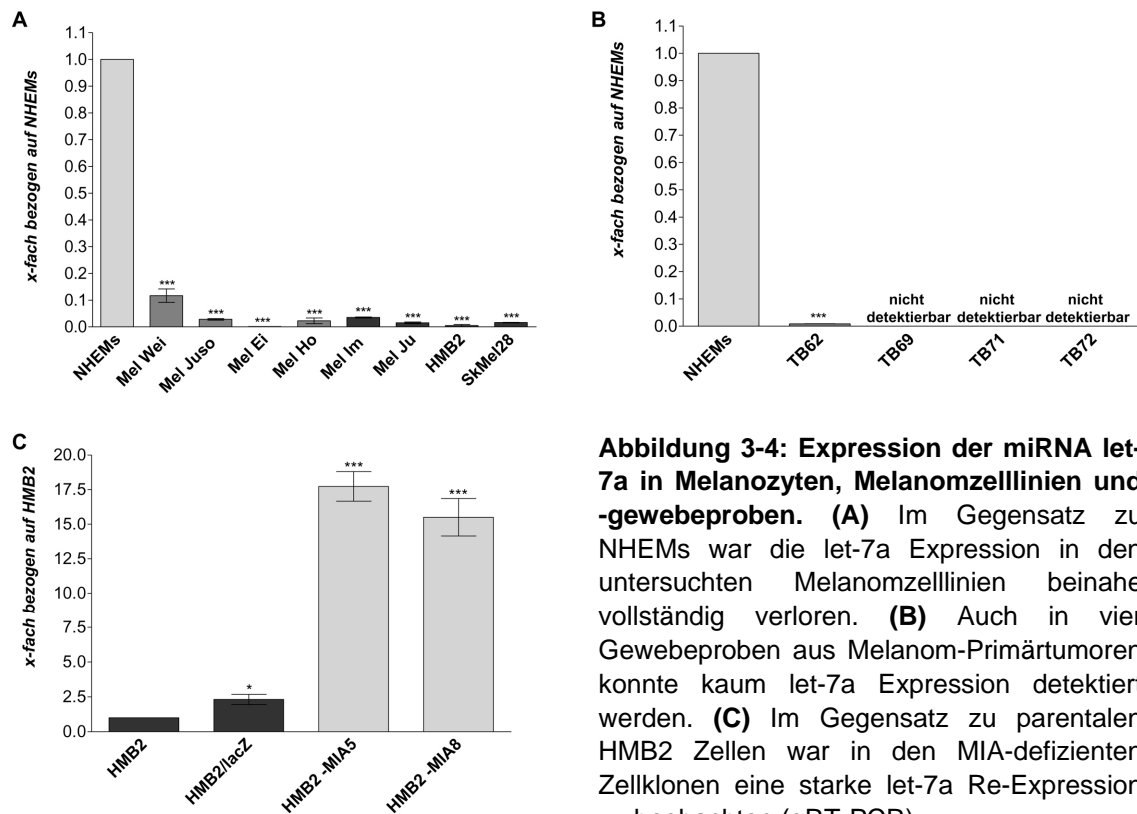


Abbildung 3-4: Expression der miRNA let-7a in Melanozyten, Melanomzelllinien und -gewebeproben. (A) Im Gegensatz zu NHEMs war die let-7a Expression in den untersuchten Melanomzelllinien beinahe vollständig verloren. **(B)** Auch in vier Gewebeproben aus Melanom-Primärtumoren konnte kaum let-7a Expression detektiert werden. **(C)** Im Gegensatz zu parentalen HMB2 Zellen war in den MIA-defizienten Zellklonen eine starke let-7a Re-Expression zu beobachten (qRT-PCR).

Die invers korrelierenden Expressionsmuster von Integrin beta3 und der miRNA let-7a gaben einen ersten Hinweis auf eine mögliche posttranskriptionelle Regulation der Integrin beta3 Expression durch die, aufgrund von *in silico* Analysen identifizierte, microRNA let-7a.

3.1.4 Analyse der Auswirkungen von let-7a pre- und anti-miRs auf die Integrin beta3 Expression

Um einen potenziellen regulatorischen Einfluss der miRNA let-7a auf die Integrin beta3 Expression zu untersuchen, wurden kommerziell erhältliche let-7a pre-miR Moleküle in zwei Melanomzelllinien (Mel Im, Mel Juso) transfiziert. Johnson und Kollegen konnten 2005 zeigen, dass let-7a an eine Target-Sequenz in der 3'UTR des Transkriptes des N-Ras Onkogens bindet und dessen Expression inhibiert (Johnson et al. 2005). Deshalb wurde 48h nach der Transfektion zuerst die Expression dieses bereits bekannten let-7a Zielgens mittels qRT-PCR analysiert, um den Erfolg der Transfektion und die Funktionsfähigkeit der pre-miR Moleküle in der Zelle zu überprüfen. Wie in Abbildung 3-5 A zu sehen, nahm die N-Ras Expression in den let-7a pre-miR transfizierten Melanomzellen auf RNA-Ebene um ca. 40 bis 60% im Vergleich zu Zellen, welche eine Negativ-Kontroll miR mit nicht funktioneller Sequenz erhalten hatten, ab. Im Anschluss wurde die Integrin beta3 Expression analysiert. Hierbei zeigte sich auf RNA-Ebene eine Herunterregulation der Expression in pre-miR

transfizierten Melanomzellen um ca. 45 bis 65% im Vergleich zu den relevanten Kontrollen (Abb. 3-5 B). Im Western Blot konnte der Knockdown der Integrin beta3 Expression durch die synthetischen let-7a Moleküle auch auf Protein-Ebene bestätigt werden (Abb. 3-5 C).

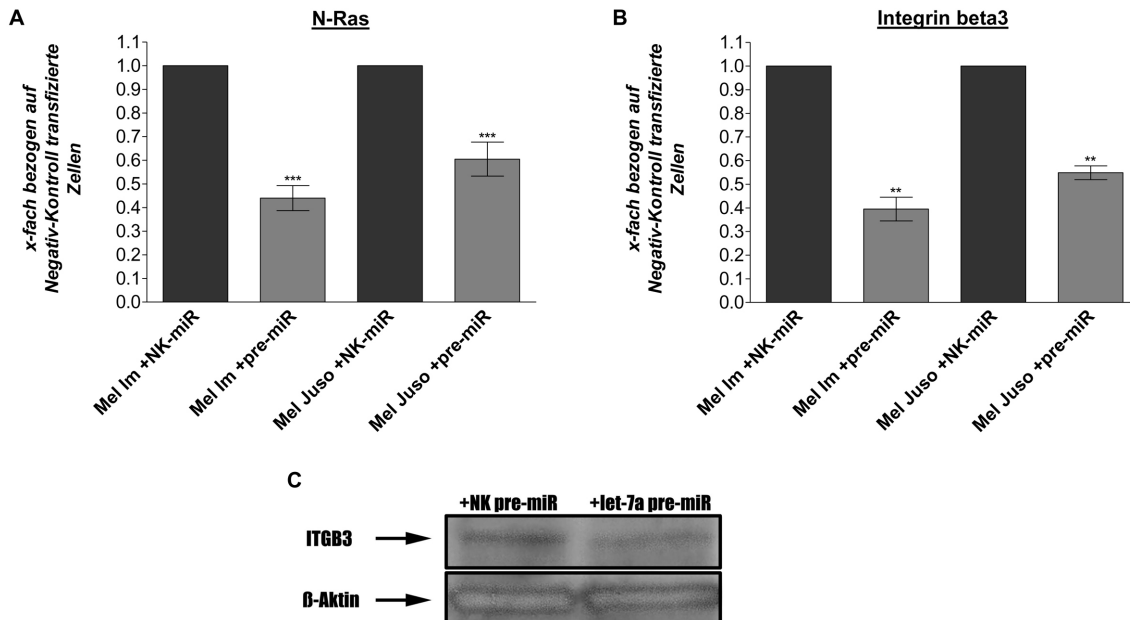


Abbildung 3-5: Einfluss der Transfektion von let-7a pre-miRs auf die Integrin beta3 Expression in Melanomzellen. (A) Die Expression des bereits bekannten let-7a Zielgens N-Ras nahm in den Melanomzelllinien Mel Im und Mel Juso nach pre-miR Transfektion um ca. 40 bis 60% ab (qRT-PCR). **(B)** Gleichzeitig war in den transfizierten Zellen eine Abnahme der Integrin beta3 Expression um ca. 45 bis 65% zu beobachten (qRT-PCR). **(C)** Auch auf Protein-Ebene konnte eine reduzierte Integrin beta3 Expression in let-7a pre-miR transfizierten Mel Im Zellen gezeigt werden (Western Blot).

In einem umgekehrten Versuchsansatz wurden Melanozyten, welche einen hohen endogenen let-7a Spiegel zeigen, mit inhibitorisch wirkenden anti-miRs gegen let-7a behandelt. Durch die Inhibition der endogenen let-7a Moleküle stieg in anti-miR transfizierten NHEMs die Integrin beta3 Expression um ca. 110% im Vergleich zu den korrespondierenden Kontrollen an (Abb. 3-6 B, linker Teil des Graphen). In den MIA-defizienten HMB2 Zellklonen HMB2-MIA5, welche unbehandelt (siehe Abb. 3-2) bzw. nach Transfektion von Negativ-Kontroll miRs keine nachweisbare Integrin beta3 Expression zeigten, konnte nach anti-miR Transfektion ein 2-fach höherer Integrin beta3 mRNA-Spiegel nachgewiesen werden, als in parentalen HMB2 Zellen (Abb. 3-6 B, rechter Teil des Graphen). Auch im Rahmen der Transfektionen mit let-7a anti-miRs diente die Quantifizierung der N-Ras Expression als Kontrolle der Transfektionseffizienz (Abb. 3-6 A). Die in den qRT-PCR Experimenten auf mRNA-Ebene festgestellte deutliche Induktion der Integrin beta3 Expression in dem MIA-defizienten HMB2 Zellklon HMB2-MIA5 konnte auch auf Protein-Ebene bestätigt werden (Abb. 3-6 C).

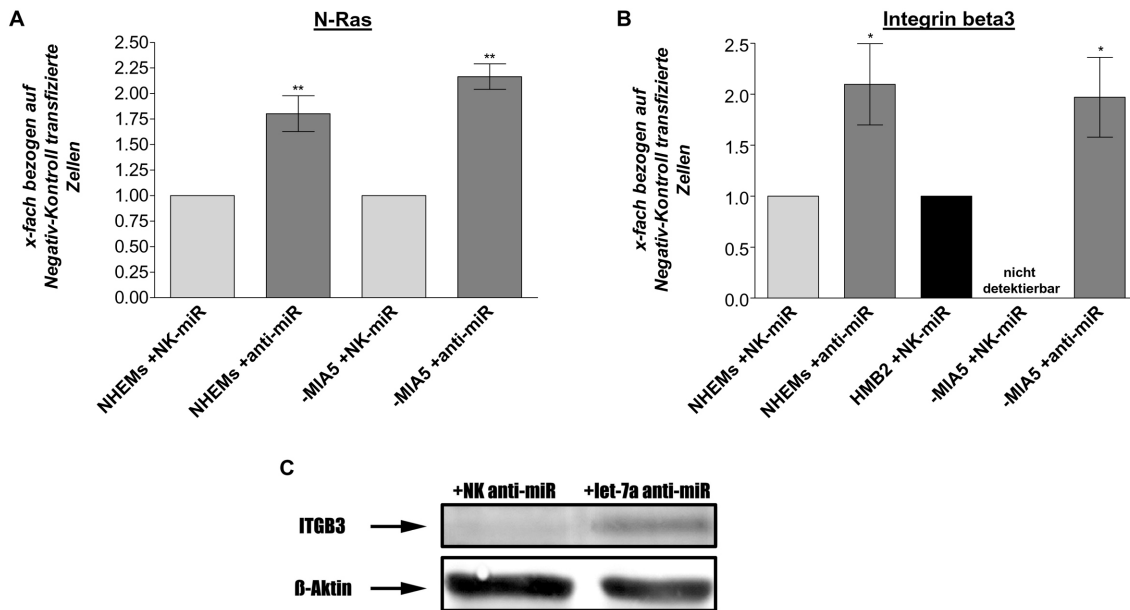


Abbildung 3-6: Einfluss der Transfektion von let-7a anti-miRs auf die Integrin beta3 Expression in Melanozyten und dem MIA-defizienten Zellklon HMB2-MIA5. (A) Die Expression des bereits bekannten let-7a Zielgens N-Ras nahm nach anti-miR Transfektion in Melanozyten um ca. 80% und in HMB2-MIA5 Zellen um ca. 120% zu (qRT-PCR). **(B)** Gleichzeitig war in den transfizierten Melanozyten eine Zunahme der Integrin beta3 Expression um ca. 110% zu beobachten. Der MIA-defiziente Zellklon zeigte dabei eine zweifach höhere Integrin beta3 Expression als parentale HMB2 Zellen (qRT-PCR). **(C)** Die Induktion der Integrin beta3 Expression in let-7a anti-miR transfizierten HMB2-MIA5 Zellen konnte auf Protein-Ebene bestätigt werden (Western Blot).

Woods et al. veröffentlichten 2001, dass eine längerfristige Aktivierung des ERK Signalweges in erhöhter Integrin beta3 Expression resultiert (Woods et al. 2001). Es musste folglich sichergestellt werden, dass die nach Transfektion von let-7a pre- bzw. anti-miRs beobachteten Veränderungen in der Integrin beta3 Expression nicht durch Effekte von let-7a auf N-Ras verursacht wurden und somit sekundärer Natur waren.

Hierzu wurde in Melanomzellen der Zelllinie Mel Im durch Transfektion von zwei gegen N-Ras gerichteten siRNAs die N-Ras Expression auf ca. 10% im Vergleich zu Kontroll-siRNA transfizierten Zellen reduziert (Abb. 3-7 A, linker Teil des Graphen). Anschließend wurde die Integrin beta3 Expression in diesen Zellen mittels qRT-PCR bestimmt, wobei sich keine signifikanten Veränderungen des Integrin beta3 mRNA-Niveaus zeigten (Abb. 3-7 B, linker Teil des Graphen).

Wurden jedoch zusätzlich zu den gegen N-Ras gerichteten siRNAs auch let-7a pre-miR Moleküle kotransfiziert, konnte wie bereits zuvor beobachtet eine Abnahme der Integrin beta3 mRNA Expression um etwa 40 bis 55% detektiert werden (Abb. 3-7 B, rechter Teil des Graphen).

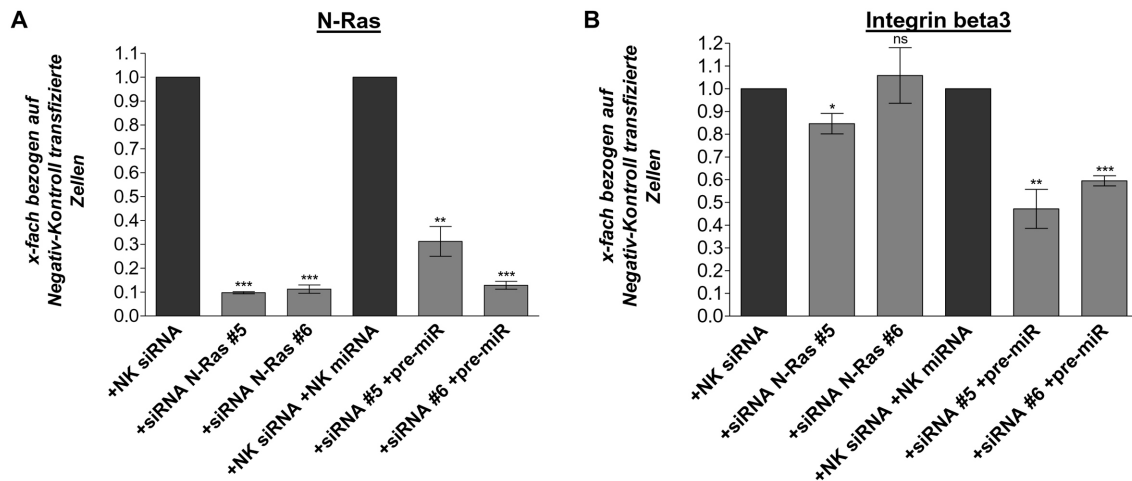


Abbildung 3-7: Einfluss des Knockdowns von N-Ras auf die Integrin beta3 Expression in Mel Im Zellen. (A) Die N-Ras Expression konnte durch Transfektion zweier unterschiedlicher siRNAs (siRNA N-Ras #5 und siRNA N-Ras #6) auf ca. 10% des ursprünglichen Wertes reduziert werden (linker Teil des Graphen). Ähnliche Effekte konnten in Versuchsansätzen, in welchen eine Kotransfektion der siRNAs gegen N-Ras zusammen mit let-7a pre-miRs erfolgte, beobachtet werden (rechter Teil des Graphen). (B) Während in den Zellen, welche ausschließlich mit gegen N-Ras gerichteten siRNAs transfiziert wurden, eine nur leicht verminderte Integrin beta3 Expression detektiert werden konnte (linker Teil des Graphen), zeigten die mit let-7a pre-miRs kotransfizierten Zellen eine um ca. 40 bis 55% verringerte Integrin beta3 Expression (rechter Teil des Graphen; qRT-PCR).

3.1.5 Nachweis der direkten Bindung von let-7a an die Integrin beta3 3'UTR

Um eine direkte Interaktion von let-7a mit der 3'UTR der Integrin beta3 mRNA nachzuweisen, wurde ein 631 bp langes Fragment der Integrin beta3 3'UTR, welches die vorhergesagte let-7a Target-Sequenz beinhaltet, hinter das Luziferase Gen eines pGL3 control Vektors kloniert (siehe 5.1.5). Dieser Vektor besitzt zusätzlich SV40 Promotor und Enhancer Sequenzen, wodurch eine starke Expression des Luziferase Gens in einem Großteil humaner Zelllinien ermöglicht wird. Nach dem Einklonieren des Integrin beta3 3'UTR Fragments entsteht bei Expression des Luziferase Gens ein Fusionstranskript bestehend aus der für die Luziferase codierenden Sequenz, gefolgt von der 3'UTR Sequenz der Integrin beta3 mRNA. Bei Anwesenheit von let-7a Molekülen sollten diese an die vorhergesagte Target-Sequenz in der Integrin beta3 3'UTR binden können und das posttranskriptionelle Silencing einleiten. Es sollte somit im Luziferase Assay nur eine schwache Lumineszenz messbar sein. Unter Abwesenheit von bindenden let-7a Molekülen sollte die Luziferase Expression nicht unterdrückt werden und somit eine starke Lumineszenz messbar sein.

Die Transfektion des Integrin beta3 3'UTR Konstruktes in Melanozyten und in die Melanomzelllinie Mel Im zeigte, dass die Luziferase Aktivität in den Melanozyten im Vergleich zu Mel Im Zellen um etwa 90% verringert war (Abb. 3-8 A). Dies entspricht einer

inversen Korrelation mit dem hohen endogenen let-7a Spiegel in Melanozyten und dem nahezu kompletten Fehlen endogener let-7a Moleküle in Mel Im Zellen. Der MIA-defiziente HMB2 Zellklon HMB2-MIA5, welcher die miRNA let-7a re-exprimiert, zeigte eine um ca. 60% verminderte Luziferase Aktivität im Vergleich zur parentalen Zelllinie HMB2 (Abb. 3-8 B).

Zusätzlich wurden Experimente durchgeführt, in welchen das Integrin beta3 3'UTR Konstrukt zusammen mit let-7a pre-miRs bzw. Negativ-Kontroll miRs in Melanomzellen der Zelllinie Mel Im kotransfiziert wurde. Die Verminderung der Luziferase Aktivität in pre-miR kotransfizierten Zellen betrug 25% im Vergleich zur korrespondierenden Kontrolle (Abb. 3-8 C, linker Teil des Graphen). Bei einem Versuchsansatz mit umgekehrter Zielsetzung, in dessen Rahmen das Integrin beta3 3'UTR Konstrukt zusammen mit let-7a anti-miRs in normale humane Melanozyten transfiziert wurde, konnte eine Steigerung der Luziferase Aktivität von 25% im Vergleich zur Negativkontrolle beobachtet werden (Abb. 3-8 C, rechter Teil des Graphen). Vermutlich sind die unter Verwendung des oben beschriebenen Versuchsaufbaus relativ gering ausfallenden Effekte, welche dennoch stabil reproduzierbar und statistisch signifikant waren, auf eine mäßige Transfektionseffizienz bei gleichzeitiger Transfektion von Plasmiden und kleinen RNA Molekülen zurückzuführen (siehe Diskussion 4.1).

Durch Site-directed Mutagenese des Integrin beta3 3'UTR Konstruktes wurden zwei Nukleotide der let-7a Target-Sequenz ausgetauscht, um die Funktionsfähigkeit der let-7a Bindestelle zu zerstören (siehe 5.1.5). Bei Transfektion dieses Integrin beta3 3'UTR Konstruktes mit mutierter let-7a Target-Sequenz in den MIA-defizienten Zellklon HMB2-MIA5 konnte eine um ca. 70% erhöhte Luziferase Aktivität im Vergleich zum 3'UTR Konstrukt mit nicht-mutierter let-7a Bindestelle detektiert werden (Abb. 3-8 B). Dennoch lag die Luziferase Aktivität in HMB2-MIA5 Zellen, welche das mutierte Plasmid erhielten, bei nur ca. 70% der Luziferase Aktivität des nicht-mutierten Konstruktes in Zellen der parentalen HMB2 Zelllinie. Die lediglich unvollständige Wiederherstellung der Luziferase Aktivität durch Mutation der let-7a Bindestelle liegt vermutlich in einem nicht ausreichend wirkungsvollen Nukleotid Austausch bei der Site-directed Mutagenese begründet. Zum Einen waren die Möglichkeiten beim Basenaustausch dadurch begrenzt, dass nach erfolgreicher Mutagenese eine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym entstehen sollte, um die Identifikation positiver Mutanten mittels enzymatischen Verdau zu gewährleisten. Zum Anderen sind sogenannte „wobble“ Basenpaarungen wesentlicher Bestandteil von miRNA:Ziel-mRNA Interaktionen, was möglicherweise zu einer partiellen Kompensation der ausgeführten Nukleotid-Austausche geführt haben könnte (siehe Diskussion 4.1).

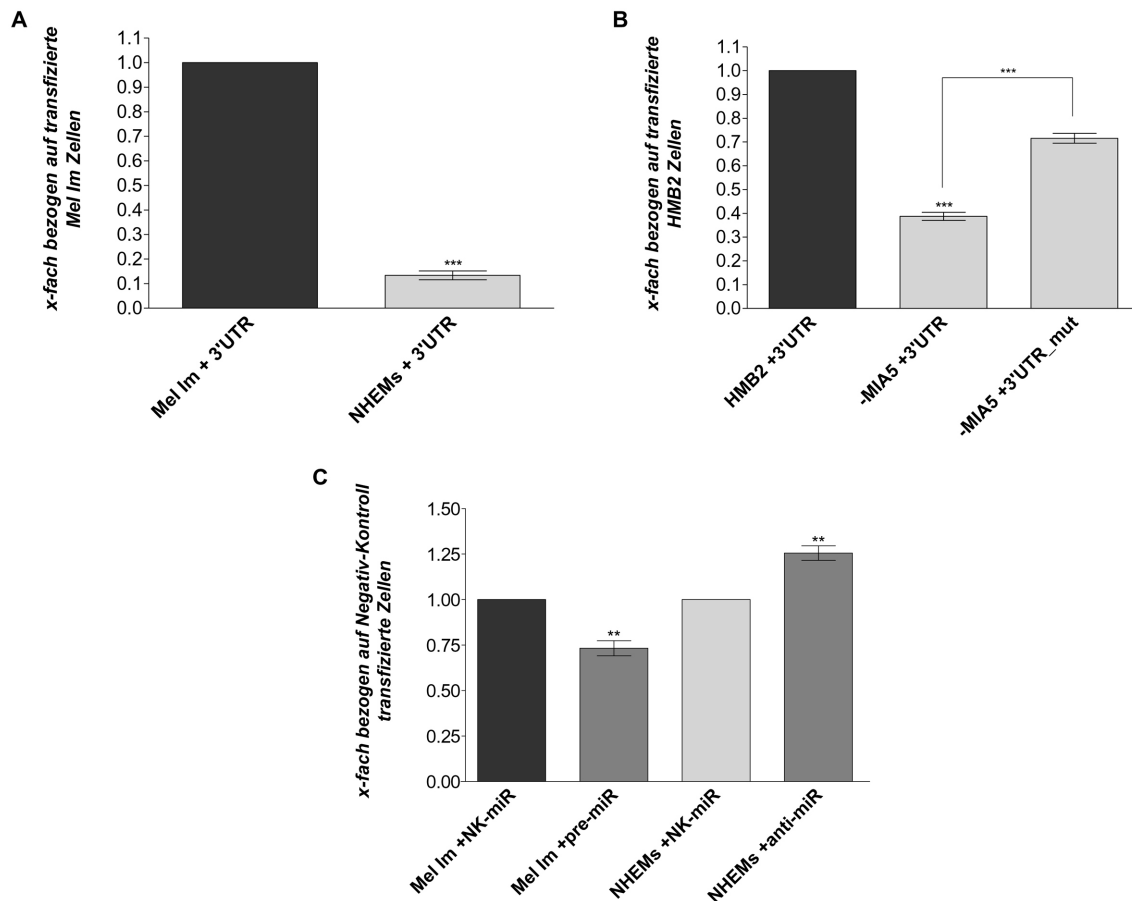


Abbildung 3-8: Nachweis der direkten Interaktion von let-7a mit einer Zielsequenz in der Integrin beta3 3'UTR. (A) Ein Reportergen, welches mit der Integrin beta3 3'UTR fusioniert war, wurde in Mel Im Zellen stark, in normalen Melanozyten jedoch kaum (ca. 10% im Vergleich zu Mel Im Zellen) exprimiert. (B) Auch in dem MIA-defizienten Zellklon HMB2-MIA5 war die Expression des Reportergens im Vergleich zu parentalen HMB2 Zellen stark (um ca. 60%) vermindert. Nach Mutagenese der let-7a target-Sequenz in der Integrin beta3 3'UTR konnte die Expression des Reportergens um ca. 70% im Vergleich zum nicht-mutierten Plasmid gesteigert werden. (C) Bei Kotransfektion des Reportergen-Plasmids zusammen mit let-7a pre-miR Molekülen konnte in Mel Im Zellen eine um 25% verminderte Expression des Reportergens detektiert werden. Umgekehrt führte eine Kotransfektion von let-7a anti-miRs in Melanozyten zu einer um 25% gesteigerten Reportergen-Expression (Luziferase-Assay).

3.1.6 Effekte der miRNA let-7a auf migratorisches und invasives Potenzial von Melanozyten und Melanomzellen

Integrin beta3 besitzt einen wesentlichen Einfluss auf das migratorische und invasive Potenzial von Tumorzellen (Johnson et al. 1999; Hsu et al. 1998). Im Boydenkammer Modell sollte untersucht werden, ob die Fähigkeit von Melanomzellen in Matrigel-beschichtete Filter zu invadieren durch Transfektion von let-7a pre-miR Molekülen reduziert werden kann. Hierbei zeigte sich, dass Mel Im Zellen, welche 48h nach Transfektion mit let-7a pre-miRs in Boydenkammer Versuche eingesetzt wurden, ein um ca. 75% verringertes invasives

Potenzial im Vergleich zu Negativ-Kontroll transfizierten oder unbehandelten Zellen besaßen (Abb. 3-9 A).

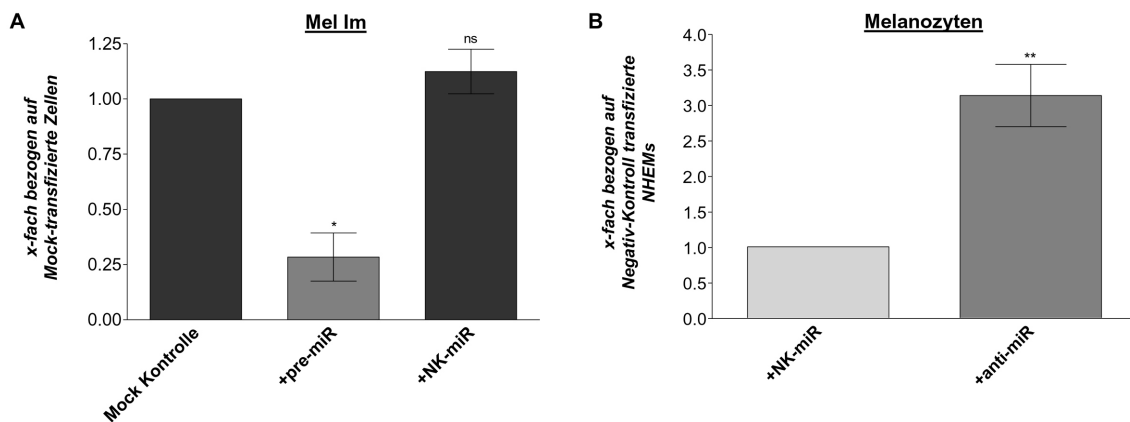


Abbildung 3-9: Einfluss der miRNA let-7a auf das invasive Potenzial von Melanomzellen bzw. die Migrationsfähigkeit von Melanozyten. (A) Durch Transfektion von let-7a pre-miRs konnte das invasive Potenzial von Mel Im Zellen um ca. 75% im Vergleich zu Mock- bzw. Negativ-Kontroll transfizierten Zellen reduziert werden. **(B)** Melanozyten konnten durch Transfektion von anti-miRs zur Migration angeregt werden und zeigten dabei ein um ca. 200% gesteigertes migratorisches Potenzial im Vergleich zu Negativ-Kontroll transfizierten Melanozyten.

Weiterhin führte die Transfektion von inhibitorischen let-7a anti-miR Molekülen zu einer gesteigerten Migrationsfähigkeit von Melanozyten. Dabei zeigten mit let-7a anti-miRs transfizierte Melanozyten ein um 200% gesteigertes migratorisches Potenzial im Vergleich zur relevanten Kontrolle (Abb. 3-9 B). Es ist anzumerken, dass bereits die zugehörigen Negativ-Kontroll behandelten Melanozyten ein geringfügig gesteigertes Wanderungsverhalten zeigten, sodass vermutlich die Transfektionsprozedur selbst eine gewisse aktivierende Wirkung auf die Melanozyten hatte. Diese fiel jedoch sehr viel schwächer aus, als die Effekte der eigentlichen Behandlung mit den gegen let-7a gerichteten anti-miR Molekülen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen konnten bereits veröffentlicht werden (Mueller und Bosserhoff, 2008).

3.2 Regulation der Expression des Homebox-Gens *HOX-C8* durch die miRNA miR-196a

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Expression des zum *Drosophila* lethal(2)giant larvae (lgl) homologen Proteins Hugl-1 (human giant larvae; Llgl/Lgl1) in Melanomzellen verloren ist. Dadurch wird die Melanomprogression, vermutlich durch einen teilweisen Verlust der Zellpolarität und somit der epithelialen Integrität, gefördert (Kuphal et al. 2006; nähere Erläuterungen siehe 1.10). Allerdings konnte die molekulare Ursache für die Fehlregulation des Tumorsuppressors Hugl-1 im Melanom im Rahmen dieser Studie nicht geklärt werden. Für das *Hugl-1* Homolog *mgl-1* (mammalian homologue of *Drosophila* lethal(2)giant larvae) wurde im Mausmodell eine Bindung des Promotors durch das Homeoboxprotein HOX-C8 gezeigt und deshalb über eine mögliche Regulation der Expression von *mgl-1* durch HOX-C8 spekuliert (Tomotsune et al. 1993). Zusätzlich zu dem vermuteten HOX-C8 Zielgen *Hugl-1* gibt es einige bereits sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bestätigte HOX-C8 Zielgene, welche wesentlich an Prozessen der Zelladhäsion und –migration, sowie an Mechanismen, die zur Hemmung der Apoptose und zu erhöhtem tumorigenen Potenzial von Zellen führen können, beteiligt sind (Lei et al. 2005; Lei et al. 2006).

Weiterhin konnten Yekta und Kollegen 2004 zeigen, dass eine miRNA, miR-196a, die Expression verschiedener HOX-Gene, darunter auch die von *HOX-C8*, steuert (Yekta et al. 2004). Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun geprüft werden, ob eine Fehlregulation der Expression von miR-196a im Melanom vorliegt. Sowie ob diese durch den regulatorischen Einfluss von miR-196a auf den Transkriptionsfaktor HOX-C8 zum Verlust der Expression des Tumorsuppressor-Proteins Hugl-1 oder zu Veränderungen in der Expression weiterer HOX-C8 Zielgene führt und dadurch ursächlich an der Tumorigenese des malignen Melanoms beteiligt ist.

3.2.1 Analyse der Expression von miR-196a und HOX-C8 in Melanozyten sowie Melanomzelllinien und –gewebeproben

Um erste Anhaltspunkte für einen potenziellen regulatorischen Zusammenhang zwischen der miRNA miR-196a und dem Homeoboxprotein HOX-C8 zu erhalten, wurde die Expression beider Moleküle auf mRNA Ebene in normalen humanen Melanozyten und acht Melanomzelllinien (drei Zelllinien aus Primärtumoren und fünf Zelllinien aus Melanom-Metastasen) untersucht. Wie Abbildung 3-10 A zeigt, kam es in allen untersuchten Melanomzelllinien zu einer starken Reduktion der miR-196a Expression um ca. 80 bis 99% im Vergleich zu Melanozyten. Im Gegensatz dazu war eine um ca. 2- bis 17-fach verstärkte HOX-C8 Expression in den Melanomzellen verglichen mit normalen Melanozyten zu

beobachten (Abb. 3-10 B). Um eine Relevanz der in den Zelllinien detektierten Veränderungen auch in der Situation *in vivo* sicherzustellen, wurde die Expression beider Moleküle zusätzlich in neun Melanomgewebeproben (vier Primärtumoren, fünf Melanom-Metastasen: subkutane Weichteilgewebs-, Haut-, Lungen-, Hirn-Metastase sowie eine Metastase unbekannter Gewebeherkunft) analysiert. Mit einer Ausnahme zeigten die untersuchten Melanome eine stark verminderte miR-196a Expression (um ca. 80 bis 90%, bis hin zu vollständigem Verlust) und eine deutlich verstärkte Expression von HOX-C8 (ca. 10- bis 80-fach) im Vergleich zu normalen humanen Melanozyten (Abb. 3-10 C und D).

Die Expressionsmuster von miR-196a und HOX-C8 wiesen also sowohl in den Melanomzelllinien als auch in den Melanomgewebeproben die notwendige inverse Korrelation auf, die Voraussetzung für einen regulatorischen Zusammenhang beider Moleküle war.

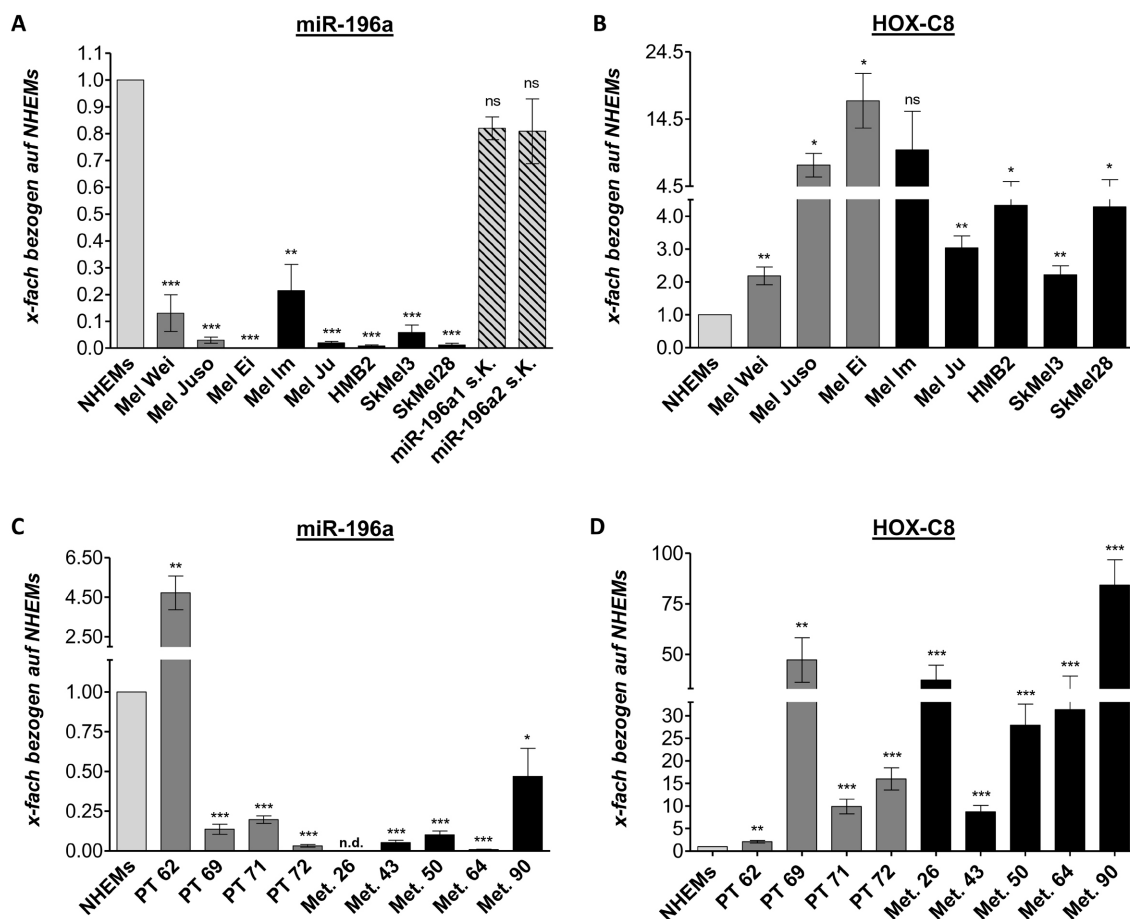


Abbildung 3-10: qRT-PCR Analyse der Expression von miR-196a und HOX-C8 in Melanozyten, Melanomzelllinien und -gewebeproben. (Fortsetzung siehe nächste Seite)

Abbildung 3-10: qRT-PCR Analyse der Expression von miR-196a und HOX-C8 in Melanozyten, Melanomzelllinien und -gewebeproben. (Fortsetzung) **(A)** Im Vergleich zu normalen Melanozyten (NHEMs) zeigten die untersuchten Melanomzelllinien lediglich eine sehr schwache miR-196a Expression. Durch stabile Transfektion mit miR-196a Expressionsplasmiden konnte in Melanomzellen der Zelllinie Mel Im eine starke Re-Expression der miRNA erreicht werden (miR-196a1 s.K. und miR-196a2 s.K.; s.K. = stabile Klone). **(B)** Im Gegensatz dazu konnte in den Melanomzelllinien eine um ca. 2- bis 17-fach verstärkte HOX-C8 Expression detektiert werden. **(C)** Mit einer Ausnahme (PT 62) zeigten auch alle untersuchten Melanomgewebeproben eine stark verminderte miR-196a Expression im Vergleich zu Melanozyten. **(D)** In den Gewebeproben mit verringerter miR-196a Expression konnte ebenfalls eine stark erhöhte HOX-C8 Expression detektiert werden. Zur besseren optischen Unterscheidung sind die Zelllinien und Gewebeproben aus Melanom-Primärtumoren zugehörigen Balken dunkelgrau, die Zelllinien und Gewebeproben aus Melanom-Metastasen zugehörigen Balken schwarz dargestellt. n.d.: nicht detektierbar.

Um weitere Hinweise auf einen regulatorischen Einfluss der miRNA miR-196a auf HOX-C8 zu erhalten, wurden Mel Im Klone generiert, welche stabil mit miR-196a Expressionskonstrukten (siehe 5.1.5) transfiziert waren. Es ist anzumerken, dass die pri-miR Sequenz der miRNA miR-196a an zwei unterschiedlichen Stellen im humanen Genom codiert wird, zum einen auf Chromosom 17 (miR-196a-1) und zum anderen auf Chromosom 12 (miR-196a-2). Jedoch führt das Ablesen beider miR-196a pri-miR Loci zur Biogenese von miRNA Molekülen mit vollständig übereinstimmender maturer Nukleotidsequenz. Im Rahmen dieser Arbeit wurden getrennte Expressionsplasmide für beide miRNA Loci hergestellt, wobei in den weiteren Versuchen keine Unterschiede in den Auswirkungen der Re-Expression von miR-196a-1 oder miR-196a-2 festgestellt werden konnten (siehe Diskussion Punkt 4.2).

Eine Analyse der miR-196a Expression in den stabilen Zellklonen zeigte eine starke Re-Expression der miRNA im Vergleich zu Leervektor transfizierten Zellen (Abb. 3-11 A). Dabei lag die miR-196a Expression in diesen Zellen bei ca. 85% der endogenen Expressionsstärke in Melanozyten (Abb. 3-10 A äußerst rechte Balken). Für die Darstellung der miR-196a Re-Expression in stabilen Mel Im Klonen in Abbildung 3-10 A wurden die Mittelwerte von drei Klonen, welche das miR-196a1 Expressionsplasmid erhalten hatten, sowie von drei Zellklonen, welche das miR-196a2 Expressionsplasmid erhalten hatten, gebildet. In Übereinstimmung mit dem vermuteten supprimierenden Effekt der miRNA auf HOX-C8 konnte in den stabil miR-196a re-exprimierenden Zellklonen eine um ca. 35% bis 70% verminderte HOX-C8 Expression detektiert werden (Abb. 3-11 B).

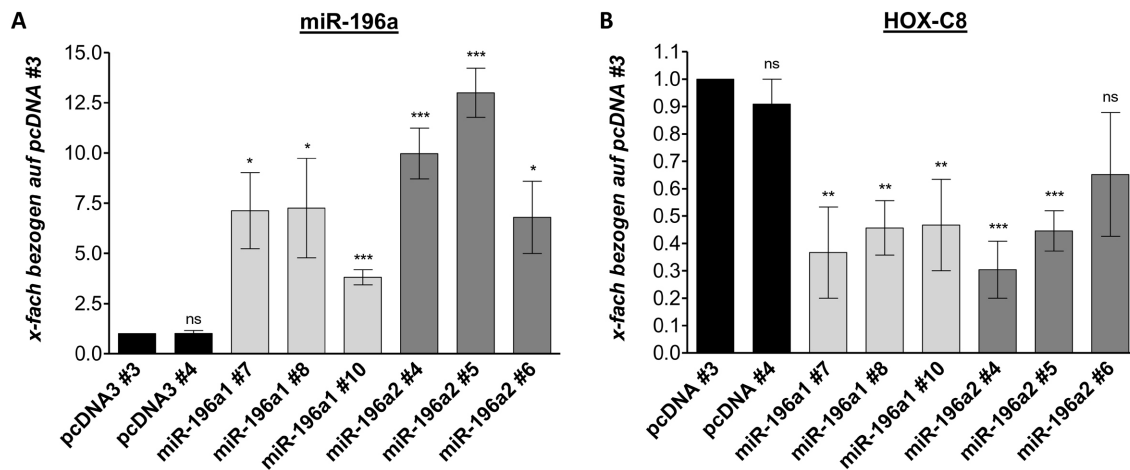


Abbildung 3-11: qRT-PCR Analyse der Expression von miR-196a und HOX-C8 in stabil mit miR-196a Expressionsplasmiden transfizierten Mel Im Zellen. (A) Im Vergleich zu Leervektor transfizierten Kontrollzellen zeigten die mit den miR-196a Expressionsplasmiden transfizierten Zellklone eine starke Re-Expression der miRNA miR-196a. **(B)** In diesen miR-196a re-exprimierenden Zellklonen nahm die HOX-C8 Expression auf mRNA Ebene um ca. 35 bis 70% im Vergleich zu den Leervektor Kontrollen ab.

3.2.2 Nachweis einer direkten Interaktion von miR-196a mit der HOX-C8 3'UTR

Um eine direkte Interaktion der miRNA miR-196a mit der 3'UTR der HOX-C8 mRNA nachzuweisen, wurde ein HOX-C8 3'UTR Reporter-Konstrukt hergestellt (siehe auch 5.1.5). Die HOX-C8 3'UTR verfügt über zwei potenzielle miR-196a Target-Sequenzen. Während Yekta und Co-Autoren in ihren Versuchen die weiter 3'-terminal gelegene Target-Sequenz analysierten (Yekta et al. 2004), wurde im Rahmen dieser Arbeit die näher am Stopp-Codon gelegene Target-Sequenz fokussiert. Grund dafür war die, durch bioinformatische Algorithmen vorhergesagte, hohe Effektivität dieser Bindestelle durch die perfekte Komplementarität der „seed“-Sequenz (siehe Diskussion 4.2).

Das HOX-C8 3'UTR Reporter-Konstrukt wurde zusammen mit den miR-196a Expressionsplasmiden, bzw. dem korrelierten Leervektor als Kontrolle in Mel Im Zellen ko-transfiziert. Dabei zeigte sich in Mel Im Zellen, welche das HOX-C8 3'UTR Reporter-Konstrukt zusammen mit einem der miR-196a Expressionsplasmide erhalten hatten, eine um bis zu 40% verminderte Luziferase-Aktivität im Vergleich zu Mel Im Zellen, welche das HOX-C8 3'UTR Reporter-Konstrukt zusammen mit dem korrelierten Leervektor erhalten hatten (Abb. 3-12).

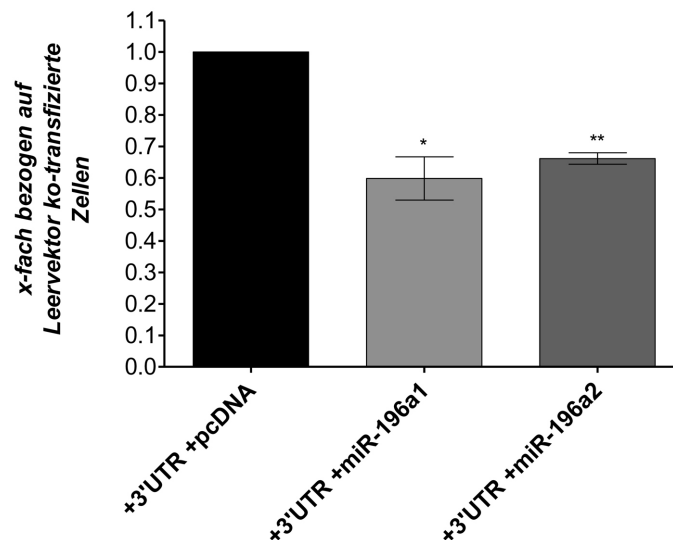


Abbildung 3-12: Luziferase Aktivität nach Ko-Transfektion eines HOX-C8 3'UTR Reporter-Konstruktes zusammen mit miR-196a Expressionsplasmiden bzw. dem zugehörigen Leervektor in Mel Im Zellen. Im Vergleich zu Kontroll-Zellen, welche neben dem HOX-C8 3'UTR Reporter Konstrukt den pcDNA3 Leervektor erhalten hatten, war die Luziferase-Aktivität in Zellen, welche ein miR-196a Expressionsplasmid erhalten hatten, um bis zu 40% vermindert.

3.2.3 Analyse der Expression von HOX-C8 Zielgenen in den stabil miR-196a re-exprimierenden Zellklonen sowie in Melanozyten und Melanomzelllinien bzw. -gewebeproben

Nachdem die Regulation der HOX-C8 Expression durch die miRNA miR-196a im malignen Melanom bestätigt werden konnte, sollte im Folgenden deren Einfluss auf die HOX-C8 Zielgene (siehe Punkt 3.2) weiter analysiert werden. Hierzu wurde zunächst die Hugi-1 Expression in den stabil miR-196a re-exprimierenden Zellklonen untersucht. Dabei zeigte sich, dass trotz der deutlich reduzierten HOX-C8 Expression in diesen Zellen (siehe Abb. 3-11 A) auf mRNA Ebene keine Veränderung in der Hugi-1 Expression festgestellt werden konnte (Abb. 3-12 A). Diese Ergebnisse wiesen auf einen von HOX-C8 unabhängigen Regulationsmechanismus der Hugi-1 Expression im humanen System hin.

Die bisherigen Ergebnisse legten nahe, dass das Homeobox-Protein HOX-C8 auch unabhängig von einer Regulation der Hugi-1 Expression mit der Progression des malignen Melanoms korreliert ist. Deshalb sollte im Weiteren untersucht werden, durch welche bereits bekannten HOX-C8 Zielgene die Fehlregulation dieses Transkriptionsfaktors Einfluss auf wesentliche Mechanismen der Tumorigenese des Melanoms ausüben könnte. Hierfür sollte die Regulation im humanen System bereits bestätigter HOX-C8 Zielgene in den stabil miR-196a re-exprimierenden Zellklonen verifiziert werden. Es stellte sich heraus, dass die Expression der HOX-C8 Zielgene *Osteopontin* (codiertes Protein: OPN; SPP1 = secreted

phosphoprotein 1, BSP-1, ETA-1), *Cadherin-11* (codiertes Protein: CDH11) und *Calponin-1* (codiertes Protein: CNN1; SMCC, Sm-Calp = smooth muscle calponin) in den stabilen miR-196a Klonen im Vergleich zu Leervektor transfizierten Kontroll-Zellen differenziell reguliert war. Dabei war eine verminderte Expression von Osteopontin und eine verstärkte Expression von Cadherin-11 sowie Calponin-1 in den miR-196a re-exprimierenden Zellklonen detektierbar (Abb. 3-12 B bis D).

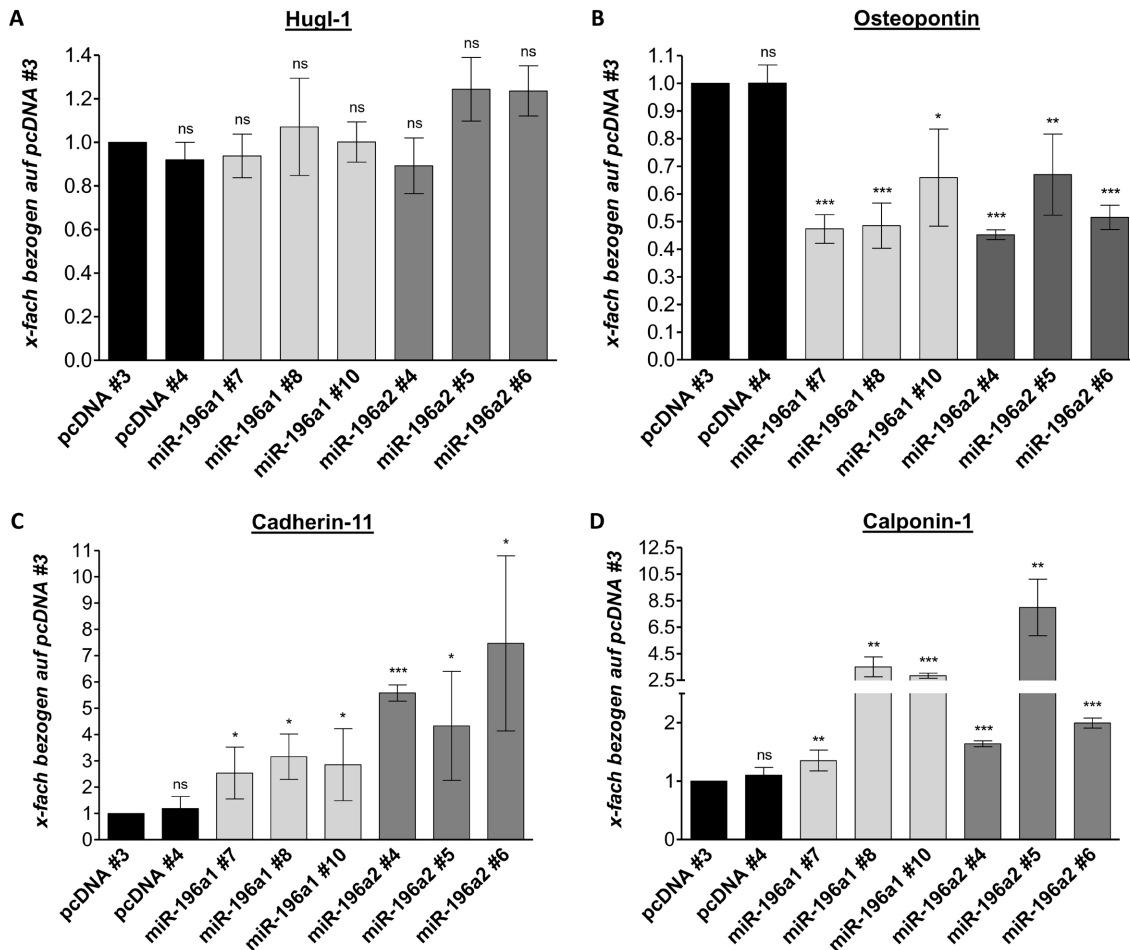


Abbildung 3-12: qRT-PCR Analyse der Expression potentieller HOX-C8 Zielgene in den stabil miR-196a re-exprimierenden Zellklonen. (A) Auf mRNA Ebene zeigte sich keine Veränderung der Hugl-1 Expression in den stabil miR-196a re-exprimierenden Zellklonen. (B) Die Osteopontin Expression nahm auf mRNA Ebene in den stabil miR-196a re-exprimierenden Zellklonen um ca. 35 bis 55% ab. (C + D) Im Gegensatz dazu stieg die Expression von Cadherin-11 (auf ca. 2,5- bis 7,5-fach) und Calponin-1 (auf ca. 1,5- bis 8-fach) in den Zellklonen deutlich an.

Um eine allgemeine Fehlregulation der in den Klonen differenziell regulierten HOX-C8 Zielgene in Melanomzellen nachzuweisen, wurde die Expression von Osteopontin, Cadherin-11 und Calponin-1 in Melanomzelllinien im Vergleich zu normalen humanen Melanozyten untersucht. Für alle drei Zielgene zeigte sich eine übereinstimmende Regulation in den acht

analysierten Melanomzelllinien, wobei eine stark induzierte Expression von Osteopontin, sowie eine deutlich verminderte Expression von Calponin-1 und ein beinahe vollständiger Verlust von Cadherin-11 in Melanomzellen festgestellt werden konnte (Abb. 3-13 A, C, D). In Melanomgewebeproben konnte lediglich die Überexpression von Osteopontin bestätigt werden (Abb. 3-13 B), da für Cadherin-11 und Calponin-1 vermutlich aufgrund von in den Proben enthaltenem Tumorstroma keine verlässlichen Aussagen getroffen werden konnten.

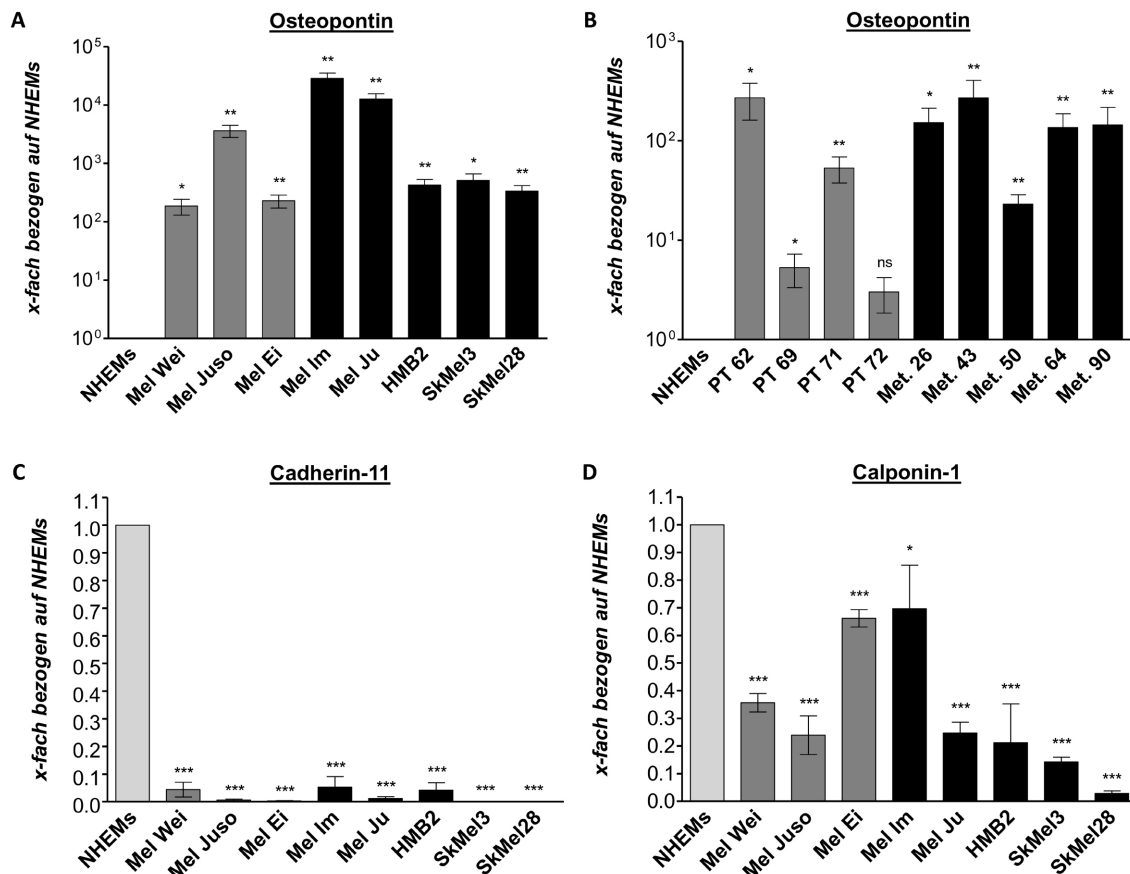


Abbildung 3-13: qRT-PCR Analyse der Expression potentieller HOX-C8 Zielgene in Melanozyten, Melanomzelllinien und -gewebeproben. (A + B) Sowohl Melanomzelllinien als auch -gewebeproben zeigten eine stark gesteigerte Osteopontin Expression im Vergleich zu normalen humanen Melanozyten. Die x-Achse ist hierbei logarithmisch skaliert. **(C)** Im Gegensatz zu Melanozyten, in welchen eine starke Cadherin-11 mRNA Expression detektiert werden konnte, zeigten die untersuchten Melanomzelllinien einen beinahe vollständigen Verlust der Cadherin-11 Expression. **(D)** Ebenso war die Expression von Calponin-1 in den Melanomzelllinien stark reduziert.

Durch die Regulation der Expression des Transkriptionsfaktors HOX-C8 übt die miRNA miR-196a also einen indirekten Effekt auf diverse Progressions-assoziierte Moleküle im malignen Melanom aus (siehe Diskussion Punkt 4.2).

3.2.4 Vorversuch zur Beeinflussung des Tumorwachstums *in vivo* durch Re-Expression von miR-196a in Melanomzellen

In den vorangegangenen Experimenten konnte eine weitreichende Auswirkung der regulatorischen Funktion von miR-196a auf die Expression von Genen, welche die Melanomprogression stark fördern, gezeigt werden. Um zu untersuchen, ob die Re-Expression von miR-196a in Melanomzellen eine Auswirkung auf deren Fähigkeiten zur Tumorbildung *in vivo* hat, wurden Vorversuche in einem Nacktmaus-Modellsystem durchgeführt. Hierzu wurden drei der stabil miR-196a re-exprimierenden Mel Im Zellklone (miR-196a2 #4, #5 und #6), sowie zwei zugehörige Leervektor Klone (pcDNA #3 und #4), subkutan in athymische (*nu/nu*) Mäuse injiziert (siehe 5.2.5). Während beide Mäuse, welche die Leervektor transfizierten Mel Im Zellen erhalten hatten, relativ schnell tastbare Tumoren entwickelten (von denen sich einer durch eine rapide Zunahme des Tumorumfanges auszeichnete), entwickelten von den sechs Mäusen, welche die miR-196a re-exprimierenden Mel Im Zellen erhalten hatten, nur drei einen tastbaren Tumor. Hierbei fand die Tumorbildung zusätzlich stark zeitverzögert statt. Nach diesem späten Tumor-„onset“ jedoch wuchsen die gebildeten Tumoren sehr rasch zu großen Tumorumfängen an. Dies gab Anlass zu der Hypothese, dass die Re-Expression von miR-196a die Tumorbildung zu Beginn effektiv verhindern konnte, die Mel Im Zellen nach längerer Verweildauer in den Mäusen jedoch das Expressionsplasmid verlieren und es dadurch zeitverzögert zum ungehemmten Tumorwachstum kommt. Um einen möglichen Verlust der miR-196a Expression in den Zellen des Tumors zu untersuchen, wurden die Tumoren aus den Mäusen entnommen und die miRNA Fraktionen aus dem Tumorgewebe isoliert (siehe 5.2.2.7). Die anschließende qRT-PCR Analyse zeigte, dass von den Tumorzellen aus den Mäusen, welche ursprünglich miR-196a re-exprimierende Mel Im Zellen erhalten hatten, ebenso wenig miR-196a exprimiert wurde, wie von den Tumorzellen aus den Kontroll-Mäusen (Abb. 3-14).

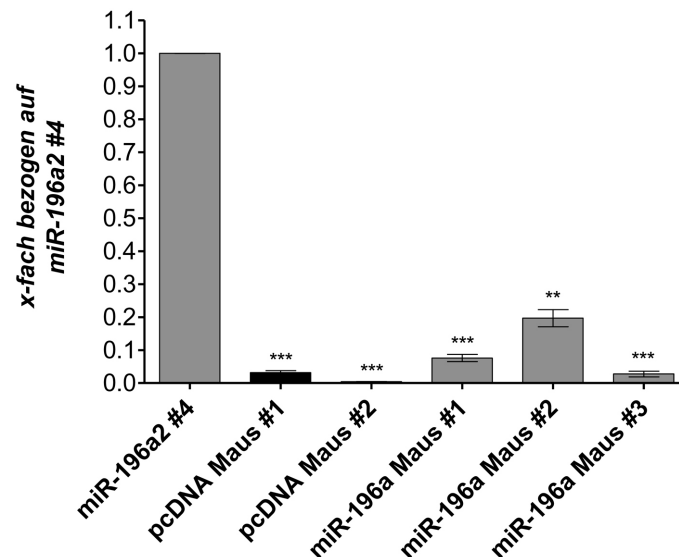


Abbildung 3-14: qRT-PCR Analyse der miR-196a Expression in den Maustumoren. Die Tumoren aus Mäusen, welche ursprünglich miR-196a re-exprimierende Mel Im Zellen erhalten hatten, zeigten eine ebenso geringe miR-196a Expression wie die Tumoren aus Mäusen, welche Kontroll-Zellen erhalten hatten. Der Vergleich erfolgte gegen den *in vitro* kultivierten, stabil miR-196a2 re-exprimierenden Zellklon #4.

Ein Manuskript, welches Teile dieser Untersuchungen enthält, wurde zur Veröffentlichung eingereicht (Braig et al.), ein weiteres befindet sich in Vorbereitung (Mueller et al.).

3.3 Identifikation im malignen Melanom fehlregulierter miRNAs durch Generierung der miRNA Expressionsprofile von Melanozyten und Melanomzelllinien

Obgleich in Forscherkreisen ein Konsens über die starken Einflüsse deregulierter miRNA Expression auf die Entstehung und Progression von Tumoren herrscht (Visone und Croce 2009; Mirnezami et al. 2009; Hwang und Mendell 2006) und diese Erkenntnis zweifelsfrei auch auf die Tumorigenese des malignen Melanoms übertragen werden kann, fehlte bis dato eine breit angelegte Analyse der miRNA Expressionsprofile von Melanozyten und etablierten Melanomzelllinien, welche zur Identifikation Melanom-assoziiierter miRNAs in ihrer Gesamtheit hätte beitragen können.

Meist resultierten die bisher, zu Veränderungen im miRNA Expressionsmuster von Melanomzellen verfügbaren Daten, aus einigen wenigen auf Microarray-Technologie, Durchflusszytometrie oder High Throughput qRT-PCR Plattformen basierenden Analysen von größeren Sätzen an Gewebeproben oder Zelllinien diverser Tumoren aus verschiedenen Organen (Lu et al. 2005; Zhang et al. 2006; Gaur et al. 2007). Dabei erfolgte die Durchführung der Versuche, sowie die Auswertung der erhaltenen Daten oftmals mit dem Ziel, eine Unterscheidung der Herkunft oder des Differenzierungsstatus der Tumoren zu

erreichen bzw. Tumormarker von diagnostischer Relevanz zu identifizieren. Weiterhin fehlte meist ein direkter Vergleich der Melanomgewebeproben oder –zelllinien zu Normalhaut-Proben bzw. normalen humanen Melanozyten, was nur eingeschränkte Aussagen zuließ.

Sofern für einzelne miRNAs bereits eine Beteiligung an der Regulation Melanom-relevanter Zielgene, wie z.B. MITF, c-KIT und p27Kip (Bemis et al. 2008; Segura et al. 2009; Felicetti et al. 2008) gezeigt werden konnte, beruhte die Identifikation der jeweiligen miRNA häufig auf der Übertragung von Entdeckungen in anderen Krebsarten auf die Situation im malignen Melanom, oder auf einer reversen Analyse. Im Falle letzt genannter wurde, ausgehend von einem interessanten Zielgen, über bioinformatische Analysen ein Set an potentiell regulierenden miRNAs ausgewählt und im Folgenden auf Interaktionen mit der mRNA des vorgegebenen Zielgens analysiert.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten nun miRNA Expressionsprofile von normalen humanen Melanozyten und etablierten Melanomzelllinien erstellt und gegeneinander abgeglichen werden, um auf diese Weise miRNAs zu identifizieren, welche in verschiedenen Stadien der Tumorigenese des malignen Melanoms dereguliert vorliegen und somit zur Entstehung und Progression dieser Krankheit beitragen könnten.

3.3.1 Vergleich der miRNA Expressionsprofile von Melanozyten und Melanomzelllinien

Unter Verwendung des „Human miRNA Microarray (V1)“ Kits der Firma Agilent (Santa Clara, USA) wurden, wie in 5.2.2.10 beschrieben, miRNA Expressionsprofile von normalen humanen Melanozyten aus zwei verschiedenen Spendern, sowie von drei aus Primärtumoren (Mel Ei, Mel Wei, Mel Juso) und vier aus Melanom-Metastasen (Mel Im, Mel Ju, HMB2, A375) isolierten Zelllinien, erstellt. Zusätzlich wurden Melanomzelllinien analysiert, in welchen die Expression der im Rahmen der frühen Melanomentstehung bedeutsamen Moleküle MIA bzw. Snail durch stabile Transfektion mit dem jeweiligen antisense-Konstrukt unterbunden wurde. Es handelte sich hierbei um die in 1.9 im Detail beschriebenen MIA-defizienten HMB2 Klone HMB2-MIA5, sowie um die in 1.8.1.2 beschriebenen antisense-Snail Klone, welche in der Zelllinie Mel Im generiert wurden. Weiterhin standen zwei Mel Im Derivate zur Verfügung, welche unterschiedlich stark invasive Subpopulationen dieser Zelllinie darstellen (Details siehe 3.3.5).

Nach Durchführung der miRNA Microarray Versuche lagen Daten zu je zwei experimentellen oder technischen Replikaten pro Zelllinie vor (Ausnahme: von den Mel Im Subpopulationen wurde nur je ein Datensatz generiert). Dabei konnte durch Verwendung der Agilent Microarray Slides (v1) die Expression von 470 humanen und 64 viralen miRNAs, entsprechend der Sanger Datenbank Version 9.1, untersucht werden.

Um feststellen zu können, ob die miRNA Expressionsmuster der einzelnen Zelllinien ihre Herkunft aus gesundem Gewebe, Melanom-Primärtumor oder Melanom-Metastase widerspiegeln, wurde im ersten Schritt der Datenanalyse eine nicht supervisierte hierarchische Clusteranalyse der Zelllinien durchgeführt. Diese Art der Analyse erfolgte zuerst für die Melanozyten, die sieben untersuchten Melanomzelllinien und den MIA-defizienten HMB2-Zellklon. Wie in Abbildung 3-15 zu sehen, separierte der dabei berechnete hierarchische Baum die Melanozyten, welche zusammen mit den MIA-defizienten HMB2-Zellen clusterten, eindeutig von den Melanomzelllinien. Letztere zeigten entgegen ihrer jeweiligen Herkunft aus Primärtumoren bzw. Melanom-Metastasen eine durchmischte Anordnung. Dabei bestand eines der Melanomsubcluster aus den beiden metastatischen Zelllinien Mel Im und Mel Ju zusammen mit der Primärtumor-Zelllinie Mel Juso und ein zweites Melanomsubcluster aus den beiden Primärtumor-Zelllinien Mel Ei und Mel Wei zusammen mit der metastatischen Zelllinie A375. Die ebenfalls aus einer Melanommetastase gewonnene Zelllinie HMB2 zweigte in einiger Distanz zu den beiden Melanomsubclustern ab.

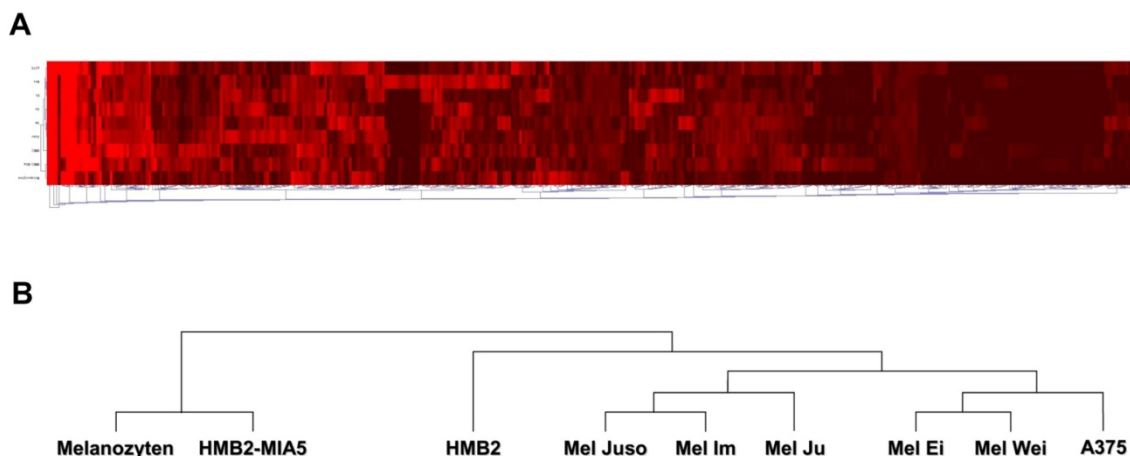


Abbildung 3-15: Nicht supervisierte hierarchische Clusteranalyse von Melanozyten, Melanomzelllinien und dem MIA-defizienten Zellklon HMB2-MIA5. (A) „Heat-map“ aller in mindestens einer untersuchten Zelllinie exprimierter miRNAs, auf deren Basis die hierarchische Clusteranalyse stattfand. **(B)** Das Ergebnis der Clusteranalyse in einem Dendrogramm präsentiert. Der berechnete Baum separierte die Melanozyten, welche zusammen mit dem MIA-defizienten Zellklon HMB2-MIA5 clusterten, deutlich von den Melanomzelllinien. Letztere zeigten entgegen ihrer klar definierten Herkunft aus Primärtumoren bzw. Metastasen eine weitgehend durchmischte Anordnung.

Es ist anzumerken, dass bei der hier durchgeführten Analyse der komplette Satz der auf den Arrays enthaltenen miRNAs in die Auswertung einging, ohne eine vorherige Einschränkung zu treffen. Lediglich die let-7 Spezies wurden aufgrund der Gefahr der Kreuzhybridisierung ausgeschlossen; es wurden also 461 der 470 repräsentierten miRNAs berücksichtigt.

Vermutlich sind die deshalb enthaltenen intrinsischen Veränderungen, welche spezifisch für die jeweilige Zelllinie sind und ebenfalls in die Berechnungen eingingen, für dieses inhomogene Bild verantwortlich. Diese Theorie wird durch Analysen gestützt, welche in der Vergangenheit zur Charakterisierung der in den miRNA Microarray Experimenten eingesetzten Zelllinien durchgeführt wurden (Jacob et al. 1998). Hierbei zeigten einzelne Zelllinien jeweils charakteristische Veränderungen, welche für ihre Herkunft untypisch waren. Wurden die Daten der einzeln betrachteten Zelllinien aber in Gruppen zusammengefasst, entsprachen die Ergebnisse den in Abhängigkeit der Herkunft gesteckten Erwartungen (ausführliche Diskussion in 4.3). Um diesen Beobachtungen gerecht zu werden, wurden für die in 3.3.2 bis 3.3.4 durchgeführten Analysen zur Identifikation deregulierter miRNAs jeweils die Mittelwerte aus den Expressionsdaten der in die entsprechenden Berechnungen eingegangenen Zelllinien verwendet, sodass Erscheinungen, welche Zelllinien-spezifisch waren, keinen Einfluss auf die Analysen hatten.

In einer weiteren nicht supervisierten hierarchischen Clusteranalyse wurden die Melanozyten zusammen mit den verwendeten Mel Im Derivaten analysiert. Hierbei zeigte sich, dass die antisense-Snail Klonen in Nachbarschaft zu den Melanozyten abzweigten, während die parental Mel Im Zellen ein Cluster mit ihren unterschiedlich invasiven Subpopulationen bildeten (Abb. 3-15). Wie in 1.8.1.2 beschrieben, wurden zur Generierung der antisense-Snail Klonen die Expression des Transkriptionsfaktors Snail in der Melanomzelllinie Mel Im durch Transfektion eines Antisense-Plasmids stark reduziert. Dies führte zu einer teilweisen Redifferenzierung der Tumorzellen in einen Melanozyten-ähnlichen Phänotyp.

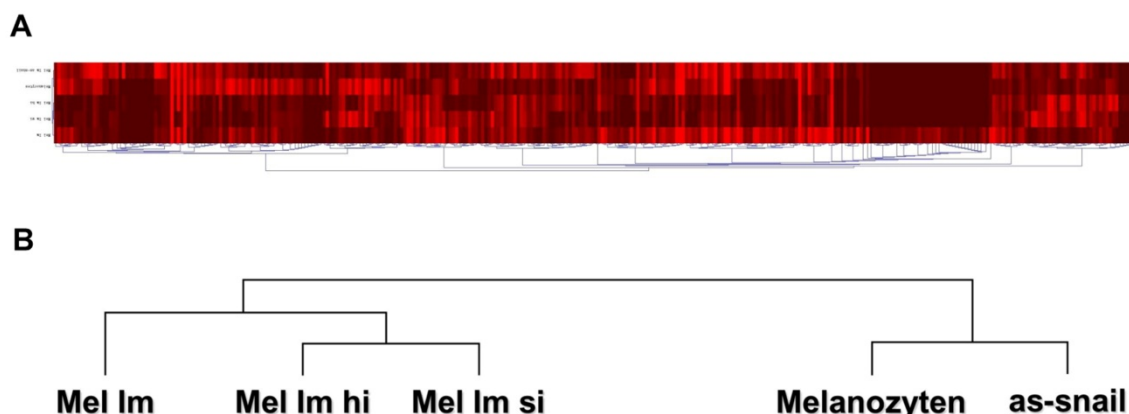


Abbildung 3-15: Nicht supervisierte hierarchische Clusteranalyse von Melanozyten und antisense-Snail Klonen, sowie den unterschiedlich stark invasiven Mel Im Subpopulationen. (A) „Heat-map“ aller, in mindestens einer untersuchten Zelllinie exprimierter miRNAs, auf deren Basis die hierarchische Clusteranalyse stattfand. **(B)** Das Ergebnis der Clusteranalyse in einem Dendrogramm präsentiert. Im berechneten Baum zweigen die antisense-Snail Klonen in direkter Nachbarschaft der Melanozyten ab, während die Mel Im Derivate ein deutlich abgetrenntes Subcluster bilden.

3.3.2 Identifikation von miRNAs, deren Expression in der Melanomentstehung dereguliert ist

Zur Identifikation bereits früh in der Melanomentwicklung deregulierter miRNAs wurde für jede miRNA der Mittelwert der Expressionsdaten in den Zelllinien aus Primärtumoren gebildet. So konnten Einflüsse von Veränderungen, welche lediglich für eine Zelllinie typisch waren, ausgeschlossen werden (siehe 3.3.1). Die erhaltenen Werte für die Primärtumor-Zelllinien wurden gegen die Werte in Melanozyten abgeglichen. Es wurden nur diejenigen miRNAs als dereguliert eingestuft, welche eine mindestens dreifach verstärkte bzw. verringerte Expression im Vergleich zu Melanozyten zeigten. Werte kleiner als 20% der Durchschnittsintensität des Fluoreszenzsignals in allen untersuchten Zelllinien wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Ebenso miRNAs, welche nur in einer einzelnen Primärtumor-Zelllinie exprimiert waren. Es wurden 91 miRNAs gefunden, welche diese Kriterien erfüllten – davon waren 77 miRNAs in Primärtumor-Zelllinien verstärkt und 14 miRNAs vermindert stark exprimiert (Tabelle 3-2). Von den 77 in Primärtumor-Zelllinien hochregulierten miRNAs waren 49 mehr als zehnfach stärker exprimiert, bzw. wurde ihre Expression erst in den Primärtumor-Zelllinien induziert, während in Melanozyten keine Expression der entsprechenden miRNA detektiert werden konnte.

miRNAs, deren Expression bereits früh in der Melanomentwicklung dereguliert ist				
Bezeichnung der miRNA	Ø Fluoreszenz in NHEMs	Ø Fluoreszenz in PT Zellen	x-fach verstärkt bzw. vermindert in PT Zellen*	SD** der Veränderung
<i>hsa-miR-106a</i>	136,98	481,46	3,5	±1,6
<i>hsa-miR-106b</i>	156,91	802,11	5,1	±0,8
<i>hsa-miR-10a</i>	10,39	200,38	19,3	±4,9
<i>hsa-miR-125a</i>	159,71	650,22	4,1	±0,9
<i>hsa-miR-126</i>	0,07	518,54	+	
<i>hsa-miR-135b</i>	0,00	290,87	+	
<i>hsa-miR-138</i>	105,49	358,79	3,4	±1,4
<i>hsa-miR-141</i>	0,00	197,06	+	
<i>hsa-miR-145</i>	0,00	240,05	+	
<i>hsa-miR-17-5p</i>	104,65	331,58	3,2	±1,5
<i>hsa-miR-181a*</i>	0,00	84,99	+	
<i>hsa-miR-181d</i>	182,20	606,81	3,3	±1,1
<i>hsa-miR-182</i>	0,00	186,74	+	
<i>hsa-miR-183</i>	0,00	346,29	+	
<i>hsa-miR-185</i>	147,58	471,46	3,2	±0,9
<i>hsa-miR-18a*</i>	0,71	436,46	+	
<i>hsa-miR-196b</i>	0,00	446,88	+	
<i>hsa-miR-19a</i>	145,33	448,17	3,1	±1,1
<i>hsa-miR-200a*</i>	0,00	159,47	+	
<i>hsa-miR-200c</i>	0,92	209,75	+	
<i>hsa-miR-20a</i>	128,01	493,81	3,9	±1,5
<i>hsa-miR-218</i>	0,00	122,62	+	
<i>hsa-miR-219</i>	197,12	638,71	3,2	±0,4

<i>hsa-miR-26b</i>	36,99	358,43	9,7	±2,0
<i>hsa-miR-27b</i>	39,78	378,71	9,5	±3,3
<i>hsa-miR-29c</i>	121,53	504,66	4,2	±2,5
<i>hsa-miR-301</i>	22,20	680,95	30,7	±10,8
<i>hsa-miR-30a-3p</i>	0,86	235,65	+	
<i>hsa-miR-326</i>	0,55	283,55	+	
<i>hsa-miR-340</i>	0,94	67,46	+	
<i>hsa-miR-346</i>	0,50	39,19	+	
<i>hsa-miR-34b</i>	161,85	585,40	3,6	±1,2
<i>hsa-miR-362</i>	21,82	153,61	7,0	±1,3
<i>hsa-miR-373</i>	0,39	80,18	+	
<i>hsa-miR-378</i>	36,71	251,96	6,9	±6,0
<i>hsa-miR-379</i>	0,00	198,10	+	
<i>hsa-miR-381</i>	117,60	467,65	4,0	±0,2
<i>hsa-miR-382</i>	0,92	145,35	+	
<i>hsa-miR-383</i>	0,00	72,64	+	
<i>hsa-miR-421</i>	42,85	407,22	9,5	±7,0
<i>hsa-miR-432</i>	131,37	453,51	3,5	±1,4
<i>hsa-miR-449</i>	0,55	130,69	+	
<i>hsa-miR-454-5p</i>	0,67	222,79	+	
<i>hsa-miR-492</i>	113,97	570,98	5,0	±2,7
<i>hsa-miR-504</i>	0,00	313,05	+	
<i>hsa-miR-506</i>	140,47	613,71	4,4	±2,5
<i>hsa-miR-507</i>	21,57	444,66	20,6	±14,8
<i>hsa-miR-508</i>	105,01	379,32	3,6	±1,0
<i>hsa-miR-509</i>	176,50	528,23	3,0	±2,3
<i>hsa-miR-517*</i>	0,00	79,52	+	
<i>hsa-miR-518a</i>	0,00	89,73	+	
<i>hsa-miR-518f*</i>	22,91	261,99	11,4	±0,5
<i>hsa-miR-519e</i>	0,00	43,78	+	
<i>hsa-miR-520b</i>	3,02	199,26	66,0	±48,8
<i>hsa-miR-520d</i>	0,84	202,80	+	
<i>hsa-miR-520d*</i>	0,88	66,75	+	
<i>hsa-miR-525</i>	0,59	55,08	+	
<i>hsa-miR-526b</i>	0,00	138,08	+	
<i>hsa-miR-545</i>	0,26	326,45	+	
<i>hsa-miR-550</i>	0,00	213,04	+	
<i>hsa-miR-557</i>	11,85	541,90	45,7	±26,2
<i>hsa-miR-560</i>	185,19	641,06	3,5	±1,0
<i>hsa-miR-564</i>	22,95	226,67	9,9	±4,6
<i>hsa-miR-566</i>	0,00	44,03	+	
<i>hsa-miR-583</i>	0,99	383,12	+	
<i>hsa-miR-590</i>	165,58	622,24	3,8	±1,2
<i>hsa-miR-615</i>	55,76	247,18	4,4	±2,8
<i>hsa-miR-622</i>	11,17	176,75	15,8	±3,5
<i>hsa-miR-628</i>	0,50	193,45	+	
<i>hsa-miR-640</i>	0,68	238,42	+	
<i>hsa-miR-641</i>	0,00	123,35	+	
<i>hsa-miR-650</i>	144,54	514,17	3,6	±3,1
<i>hsa-miR-652</i>	181,05	629,11	3,5	±0,9
<i>hsa-miR-658</i>	10,97	217,47	19,8	±4,2
<i>hsa-miR-662</i>	55,27	617,30	11,2	±1,0
<i>hsa-miR-758</i>	0,90	82,90	+	
<i>hsa-miR-768-3p</i>	186,02	682,30	3,7	±1,6
<i>hsa-miR-9</i>	0,00	515,12	+	
<i>hsa-miR-92</i>	217,33	716,46	3,3	±1,4

<i>hsa-miR-92b</i>	0,00	385,96	+	
<i>hsa-miR-98</i>	142,28	478,14	3,4	$\pm 2,2$
<i>hsa-miR-148b</i>	934,21	277,42	0,30	$\pm 0,05$
<i>hsa-miR-181a</i>	659,22	197,79	0,30	$\pm 0,25$
<i>hsa-miR-194</i>	119,40	26,92	0,23	$\pm 0,39$
<i>hsa-miR-206</i>	494,29	158,24	0,32	$\pm 0,31$
<i>hsa-miR-23b</i>	897,23	215,30	0,24	$\pm 0,09$
<i>hsa-miR-299-3p</i>	142,41	27,44	0,19	$\pm 0,28$
<i>hsa-miR-324-5p</i>	655,04	133,31	0,20	$\pm 0,01$
<i>hsa-miR-331</i>	908,83	130,53	0,14	$\pm 0,02$
<i>hsa-miR-363</i>	942,58	236,57	0,25	$\pm 0,15$
<i>hsa-miR-422b</i>	850,99	256,10	0,30	$\pm 0,10$
<i>hsa-miR-455</i>	804,66	137,51	0,17	$\pm 0,30$
<i>hsa-miR-485-3p</i>	689,36	158,89	0,23	$\pm 0,12$
<i>hsa-miR-489</i>	709,93	156,48	0,22	$\pm 0,16$
<i>hsa-miR-503</i>	352,79	83,62	0,24	$\pm 0,18$
<i>hsa-miR-527</i>	219,31	50,06	0,23	$\pm 0,22$
<i>hsa-miR-595</i>	823,19	150,21	0,18	$\pm 0,06$
<i>hsa-miR-766</i>	718,58	239,19	0,33	$\pm 0,27$

Tabelle 3-2: Liste in der Melanomentstehung dereguliert auftretender miRNAs. Verglichen wurde die durchschnittliche Expression der jeweiligen miRNA in einem Melanozyten-„Pool“ mit dem Mittelwert der Expression in den untersuchten Zelllinien aus Melanom-Primärtumoren.

*: Zahlen geben x-fach Werte für die in Primärtumor-Zelllinien im Vergleich zu Melanozyten gesteigerte oder verringerte Expression an; „+“ bedeutet induzierte Expression in Primärtumor-Zelllinien. **: Standardabweichung der Werte für x-fach gesteigerte oder verringerte Expression.

3.3.3 Identifikation von miRNAs, deren Expression in der Metastasierung des malignen Melanoms dereguliert ist

Die Identifikation von miRNAs, welche an der Metastasierung des malignen Melanoms beteiligt sein könnten, erfolgte über einen Abgleich der Mittelwerte der Expressionsprofile von Primärtumor-Zelllinien gegen die der metastatischen Zelllinien. Zusätzlich zu den in 3.3.2 genannten Kriterien mussten die hierbei als Metastasierungs-assoziiert gewerteten miRNAs in Primärtumor-Zelllinien und Melanozyten gleich stark exprimiert sein. Eine Deregulation durfte also erst in den metastatischen Zelllinien vorliegen. Auf diese Weise konnten 13 deregulierte miRNAs identifiziert werden, wobei 11 davon in den metastatischen Zelllinien verstärkt und 2 vermindert stark exprimiert waren (Tabelle 3-3).

<u>miRNAs, welche in metastatischen Zelllinien verstärkt exprimiert werden</u>		
<i>hsa-miR-199a*</i>	<i>hsa-miR-515-3p</i>	<i>hsa-miR-519d</i>
<i>hsa-miR-302c*</i>	<i>hsa-miR-517b</i>	<i>hsa-miR-520f</i>
<i>hsa-miR-30a-5p</i>	<i>hsa-miR-518b</i>	<i>hsa-miR-523</i>
<i>hsa-miR-425-3p</i>	<i>hsa-miR-519b</i>	
<u>miRNAs, welche in metastatischen Zelllinien vermindert stark exprimiert werden</u>		
<i>hsa-miR-30e-3p</i>	<i>hsa-miR-514</i>	

Tabelle 3-3: Liste der mit der Metastasierung des malignen Melanoms assoziierten miRNAs. Es wurden die Mittelwerte der Expression in metastatischen Zelllinien gegen die Mittelwerte der Expression in Primärtumorzelllinien abgeglichen.

3.3.4 Identifikation von miRNAs, die mit der Melanomprogression assoziiert sind

Um miRNAs zu identifizieren, deren deregulierte Expression mit der Melanomprogression assoziiert ist, wurden miRNAs gefiltert, die sowohl im Vergleich von Melanozyten zu Primärtumor-Zelllinien als auch im Vergleich von Primärtumor-Zelllinien zu metastatischen Zelllinien jeweils stärker als dreifach hoch- bzw. herunterreguliert erschienen. Dabei konnten folgende 6 miRNAs, welche im Laufe der Progression sukzessive verstärkt exprimiert vorlagen, identifiziert werden: miR-133a, miR-199b, miR-453, miR-520f, miR-521, miR-551b. Desweiteren konnte miR-190 als eine im Laufe der Progression stetig vermindert exprimierte miRNA ermittelt werden.

Zusätzlich wurden durch einen Abgleich der Listen von miRNAs, welche in der frühen Melanomentwicklung bzw. in der Metastasierung dereguliert vorlagen, 7 miRNAs identifiziert, welche graduell gegenläufig reguliert werden. Dabei waren 5 dieser miRNAs in Primärtumoren hoch- und in metastastatischen Zelllinien wieder herunterreguliert: miR-126, miR-29c, miR-506, miR-507, miR-520d*. Umgekehrt wurden miR-489, miR-527 in der frühen Entwicklung vermindert und in der anschließenden Metastasierung wieder verstärkt exprimiert.

3.3.5 Identifikation von miRNAs, deren Expression in den Melanom-Modellsystemen dereguliert ist

Wie in Punkt 1.9 beschrieben, steht unserer Arbeitsgruppe ein Modellsystem für die Untersuchung früher Mechanismen der Melanomentstehung zur Verfügung. Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, ob zusätzlich zu den Ähnlichkeiten der MIA-defizienten HMB2 Zellklone zu normalen humanen Melanozyten auf Ebene der

Genexpression auch Übereinstimmungen in den miRnomen, also der Gesamtheit der in diesen Zellen exprimierten miRNAs, dieser beiden Zelltypen bestehen. In der unter 3.3.1 beschriebenen hierarchischen Clusteranalyse konnte bereits gezeigt werden, dass die HMB2-MIA5 Zellen, deutlich getrennt von den anderen Melanomzelllinien, zusammen mit den Melanozyten clustern. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf ähnliche miRNA Expressionsmuster der beiden Zelltypen. Eine Analyse, bei der diejenigen miRNAs, welche bei einem Vergleich von Melanozyten und HMB2-MIA5 Zellen eine Schwankungsbreite von weniger als 30% zeigten, als gleichförmig exprimiert eingestuft wurden, verdeutlichte dies. Hierbei wurden 311 der 461 untersuchten miRNAs (ca. 70%) als gleichförmig exprimiert ermittelt.

Ein Vergleich der miRNA Expressionsprofile der parentalen Zelllinie HMB2 und der MIA-defizienten HMB2-MIA5 Zellen wies 83 miRNAs mit deregulierter Expression aus, wobei 30 miRNAs verstärkt und 53 miRNAs vermindert stark in den MIA-defizienten Zellklonen exprimiert wurden (Tabelle 3-4). Stärker als 10-fach hoch- bzw. herunterreguliert waren 12 bzw. 34 dieser miRNAs. Interessanterweise wird in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass die Mehrzahl der beim Vergleich von Primärtumor-Zelllinien mit normalen Melanozyten deregulierten miRNAs in den Primärtumor-Zelllinien verstärkt exprimiert wird (siehe 3.3.2), der überwiegende Teil deregulierter miRNAs (ca. 60%) in den MIA-defizienten Zellklonen vermindert stark exprimiert.

miRNAs, welche in dem MIA-defizienten Zellklon HMB2-MIA5 differenziell reguliert sind				
Bezeichnung der miRNA	Ø Fluoreszenz in HMB2	Ø Fluoreszenz in HMB2-MIA5	x-fach verstärkt bzw. vermindert in HMB2-MIA5*	SD** der Veränderung
<i>hsa-miR-10b</i>	0,00	457,39	+	
<i>hsa-miR-125a</i>	177,15	622,13	3,5	±0,6
<i>hsa-miR-130a</i>	617,17	2493,57	4,0	±0,9
<i>hsa-miR-133b</i>	38,73	451,92	11,7	±16,5
<i>hsa-miR-140</i>	137,03	582,73	4,3	±1,2
<i>hsa-miR-143</i>	56,22	222,04	3,9	±0,6
<i>hsa-miR-145</i>	0,00	346,04	+	
<i>hsa-miR-181c</i>	107,33	564,69	5,3	±0,8
<i>hsa-miR-181d</i>	222,19	849,84	3,8	±0,5
<i>hsa-miR-186</i>	126,35	495,99	3,9	±4,3
<i>hsa-miR-196b</i>	80,00	403,88	5,0	±1,2
<i>hsa-miR-199a*</i>	78,64	332,12	4,2	±1,2
<i>hsa-miR-224</i>	0,00	654,96	+	
<i>hsa-miR-31</i>	121,90	556,86	4,6	±1,1
<i>hsa-miR-326</i>	117,19	365,58	3,1	±0,1
<i>hsa-miR-328</i>	112,20	383,55	3,4	±4,7
<i>hsa-miR-335</i>	0,00	100,92	+	
<i>hsa-miR-34c</i>	0,22	831,45	+	
<i>hsa-miR-425-5p</i>	172,47	653,59	3,8	±0,8
<i>hsa-miR-483</i>	133,37	469,63	3,5	±3,8

<i>hsa-miR-485-3p</i>	0,25	107,64	+	
<i>hsa-miR-492</i>	149,24	542,91	3,6	±0,2
<i>hsa-miR-498</i>	174,51	862,10	4,9	±0,7
<i>hsa-miR-502</i>	110,76	350,76	3,2	±0,2
<i>hsa-miR-520d*</i>	57,68	209,70	3,6	±0,4
<i>hsa-miR-523</i>	85,27	385,63	4,5	±6,4
<i>hsa-miR-539</i>	0,00	161,27	+	
<i>hsa-miR-557</i>	139,09	741,68	5,3	±0,6
<i>hsa-miR-574</i>	152,30	654,55	4,3	±0,4
<i>hsa-miR-592</i>	58,58	273,53	4,7	±3,1
<i>hsa-miR-605</i>	174,11	604,40	3,5	±0,3
<i>hsa-miR-606</i>	0,00	155,09	+	
<i>hsa-miR-609</i>	0,40	481,12	+	
<i>hsa-miR-615</i>	51,27	169,53	3,3	±0,01
<i>hsa-miR-640</i>	0,50	250,61	+	
<i>hsa-miR-9*</i>	0,03	291,11	+	
<i>hsa-miR-126*</i>	261,77	0,00	-	
<i>hsa-miR-135b</i>	298,35	56,61	0,19	±0,27
<i>hsa-miR-141</i>	597,51	0,47	-	
<i>hsa-miR-146a</i>	4446,92	249,15	0,06	±0,01
<i>hsa-miR-148a</i>	735,88	0,00	-	
<i>hsa-miR-149</i>	554,58	142,54	0,26	±0,04
<i>hsa-miR-193b</i>	541,34	104,59	0,19	±0,27
<i>hsa-miR-196a</i>	230,15	0,76	-	
<i>hsa-miR-203</i>	332,96	6,90	0,02	±0,03
<i>hsa-miR-21</i>	8209,83	368,74	0,04	±0,02
<i>hsa-miR-223</i>	102,14	34,03	0,33	±0,19
<i>hsa-miR-29a</i>	7496,24	1792,53	0,24	±0,06
<i>hsa-miR-29b</i>	8363,77	2011,06	0,24	±0,06
<i>hsa-miR-30c</i>	608,07	171,26	0,28	±0,06
<i>hsa-miR-345</i>	135,22	0,22	-	
<i>hsa-miR-362</i>	519,24	79,59	0,15	±0,21
<i>hsa-miR-365</i>	810,82	179,02	0,22	±0,12
<i>hsa-miR-373</i>	124,83	0,96	-	
<i>hsa-miR-374</i>	199,39	0,00	-	
<i>hsa-miR-409-3p</i>	397,51	65,30	0,16	±0,23
<i>hsa-miR-423</i>	954,59	316,70	0,33	±0,06
<i>hsa-miR-431</i>	593,99	89,57	0,15	±0,21
<i>hsa-miR-449</i>	394,81	0,09	-	
<i>hsa-miR-454-3p</i>	324,93	5,83	0,02	±0,03
<i>hsa-miR-487a</i>	130,97	0,19	-	
<i>hsa-miR-506</i>	487,68	0,55	-	
<i>hsa-miR-507</i>	337,07	0,00	-	
<i>hsa-miR-508</i>	317,36	76,71	0,24	±0,34
<i>hsa-miR-514</i>	784,83	0,00	-	
<i>hsa-miR-518d</i>	174,59	0,17	-	
<i>hsa-miR-526b</i>	95,77	18,62	0,19	±0,002
<i>hsa-miR-545</i>	562,24	0,05	-	
<i>hsa-miR-550</i>	167,37	0,00	-	
<i>hsa-miR-551b</i>	322,42	0,00	-	
<i>hsa-miR-563</i>	97,79	15,00	0,15	±0,21
<i>hsa-miR-565</i>	1612,80	0,00	-	
<i>hsa-miR-571</i>	109,14	0,06	-	
<i>hsa-miR-577</i>	273,65	0,00	-	

<i>hsa-miR-583</i>	506,40	0,46	-	
<i>hsa-miR-596</i>	278,10	0,55	-	
<i>hsa-miR-625</i>	168,93	0,25	-	
<i>hsa-miR-627</i>	597,08	0,00	-	
<i>hsa-miR-629</i>	954,57	137,47	0,14	±0,17
<i>hsa-miR-632</i>	105,63	0,11	-	
<i>hsa-miR-641</i>	262,27	0,13	-	
<i>hsa-miR-654</i>	375,42	45,89	0,12	±0,17
<i>hsa-miR-658</i>	672,95	70,41	0,10	±0,15
<i>hsa-miR-660</i>	532,48	0,00	-	
<i>hsa-miR-767-5p</i>	140,58	0,00	-	
<i>hsa-miR-768-3p</i>	115,60	0,00	-	
<i>hsa-miR-768-5p</i>	517,50	64,50	0,12	±0,17
<i>hsa-miR-769-5p</i>	818,00	0,00	-	
<i>hsa-miR-92b</i>	446,13	84,36	0,19	±0,27

Tabelle 3-4: Liste der miRNAs, welche im melanozytären Modellsystem dereguliert auftraten. Verglichen wurde der Mittelwert der Expression der jeweiligen miRNA in den Replikaten der parentalen Melanomzelllinie HMB2 mit dem Mittelwert der Expression in den Replikaten des MIA-defizienten Zellklons HMB2-MIA5.

*: Zahlen geben x-fach Werte für die in HMB2-MIA5 im Vergleich zu parentalen HMB2 Zellen gesteigerte oder verringerte Expression an; „+“ bedeutet induzierte Expression in HMB2-MIA5, „-“ bedeutet keine Expression in HMB2-MIA5. **: Standardabweichung der Werte für x-fach gesteigerte oder verringerte Expression.

Um für zukünftige Analysen besonders interessante miRNAs auszuwählen, wurde durch einen Abgleich der Listen von miRNAs, welche im Vergleich Primärtumor-Zelllinien zu Melanozyten bzw. im Vergleich des MIA-defizienten Zellklons gegenüber der parentalen HMB2 Zelllinie als dereguliert gefunden wurden, durchgeführt. Hierbei konnte eine Auswahl von 18 miRNAs, welche aufgrund dieses Analyseansatzes mit hoher Wahrscheinlichkeit mit frühen, fundamentalen Mechanismen der Melanom-Tumorigenese assoziiert sind, identifiziert werden (Tabelle 3-5).

<u>Schnittmenge aus früher Progression und melanozytären Modellsystem</u>	
Bezeichnung der miRNA	verstärkt / vermindert exprimiert*
<i>hsa-miR-135b</i>	+ / -
<i>hsa-miR-141</i>	+ / -
<i>hsa-miR-362</i>	+ / -
<i>hsa-miR-373</i>	+ / -
<i>hsa-miR-449</i>	+ / -
<i>hsa-miR-506</i>	+ / -
<i>hsa-miR-507</i>	+ / -
<i>hsa-miR-508</i>	+ / -
<i>hsa-miR-526b</i>	+ / -
<i>hsa-miR-545</i>	+ / -
<i>hsa-miR-550</i>	+ / -
<i>hsa-miR-551b</i>	+ / -
<i>hsa-miR-583</i>	+ / -
<i>hsa-miR-641</i>	+ / -
<i>hsa-miR-658</i>	+ / -
<i>hsa-miR-768-3p</i>	+ / -
<i>hsa-miR-92b</i>	+ / -
<i>hsa-miR-485-3p</i>	- / +

Tabelle 3-5: Liste mit in der Melanomentstehung und im melanozytären Modellsystem gleichförmig regulierten miRNAs. Es wurde hierfür die Schnittmenge von miRNAs, welche beim Vergleich von Melanozyten zu Primärtumor-Zelllinien als differenziell reguliert gefunden wurden, mit miRNAs, welche gleichförmig im HMB2/HMB2-MIA5 Zellsystem dereguliert auftraten, gebildet.

*: „+/-“ bedeutet, in Primärtumor-Zelllinien verstärkt exprimiert und nach MIA-knockdown vermindert exprimiert. „-/+“ bedeutet, in Primärtumor-Zelllinien vermindert exprimiert und nach MIA-knockdown verstärkt exprimiert.

Mel Im Klon, in welchen die Expression des Transkriptionsfaktors Snail durch stabile Transfektion mit einem antisense Plasmid unterbunden wurde, dienen als weiteres Modellsystem, um gezielt Schritte der Melanomentstehung nach zu verfolgen (siehe 1.8.1.2). Somit sollte ein Vergleich der miRNA Expressionsprofile der stabilen as-Snail Zellklone und der parentalen Zelllinie Mel Im deshalb weitere Hinweise auf miRNAs geben, welche in der Melanomentstehung fehlreguliert werden, sowie auf miRNAs, deren Expression möglicherweise durch Snail reguliert werden könnte. Es zeigten sich 64 differenziell regulierte miRNAs, davon 46 verstärkt und weitere 18 vermindert exprimiert in den as-Snail Klonen (siehe Tab. 3-6).

<u>In as-Snail Klonen verstärkt exprimiert miRNAs</u>		
<i>hsa-miR-125b</i>	<i>hsa-miR-206</i>	<i>hsa-miR-450</i>
<i>hsa-miR-126</i>	<i>hsa-miR-21</i>	<i>hsa-miR-506</i>
<i>hsa-miR-130a</i>	<i>hsa-miR-218</i>	<i>hsa-miR-507</i>
<i>hsa-miR-143</i>	<i>hsa-miR-224</i>	<i>hsa-miR-526b</i>
<i>hsa-miR-148b</i>	<i>hsa-miR-23a</i>	<i>hsa-miR-592</i>
<i>hsa-miR-15b</i>	<i>hsa-miR-23b</i>	<i>hsa-miR-596</i>
<i>hsa-miR-181a*</i>	<i>hsa-miR-26a</i>	<i>hsa-miR-598</i>
<i>hsa-miR-189</i>	<i>hsa-miR-32</i>	<i>hsa-miR-606</i>
<i>hsa-miR-191</i>	<i>hsa-miR-324-5p</i>	<i>hsa-miR-624</i>
<i>hsa-miR-191*</i>	<i>hsa-miR-330</i>	<i>hsa-miR-641</i>
<i>hsa-miR-192</i>	<i>hsa-miR-335</i>	<i>hsa-miR-660</i>
<i>hsa-miR-194</i>	<i>hsa-miR-362</i>	<i>hsa-miR-663</i>
<i>hsa-miR-195</i>	<i>hsa-miR-378</i>	<i>hsa-miR-9*</i>
<i>hsa-miR-196a</i>	<i>hsa-miR-425-3p</i>	<i>hsa-miR-96</i>
<i>hsa-miR-199a*</i>	<i>hsa-miR-431</i>	
<i>hsa-miR-200a*</i>	<i>hsa-miR-432</i>	
<u>In as-Snail Klonen vermindert exprimierte miRNAs</u>		
<i>hsa-miR-122a</i>	<i>hsa-miR-365</i>	<i>hsa-miR-489</i>
<i>hsa-miR-181d</i>	<i>hsa-miR-381</i>	<i>hsa-miR-491</i>
<i>hsa-miR-196b</i>	<i>hsa-miR-382</i>	<i>hsa-miR-517*</i>
<i>hsa-miR-299-5p</i>	<i>hsa-miR-383</i>	<i>hsa-miR-539</i>
<i>hsa-miR-34b</i>	<i>hsa-miR-423</i>	<i>hsa-miR-551b</i>
<i>hsa-miR-363</i>	<i>hsa-miR-454-5p</i>	<i>hsa-miR-758</i>

Tabelle 3-6: Liste mit miRNAs, welche in den as-Snail Klonen differenziell reguliert auftraten. Der Abgleich erfolgte gegen die parentale Zelllinie Mel Im.

Weiterhin wurden zwei stabile Subpopulationen von Mel Im Zellen analysiert, welche durch Unterschiede in ihrem invasiven Potenzial gekennzeichnet sind (Jacob et al. 1995). Während die hoch-invasive Subpopulation Mel Im „hi“ ein um 150% höheres invasives Potenzial gegenüber Zellen der parentalen Zelllinie Mel Im besitzt, verfügt die schwach-invasive Subpopulation Mel Im „si“ über lediglich 50% der Invasivität der parentalen Zellen. Die stabilen Subpopulationen wurden durch wiederholte Passagierung einer Ausgangskultur in Boydenkammern voneinander getrennt. Hierzu wurden durch sukzessives Auftragen derjenigen Zellen, welche innerhalb eines definiert kurzen Zeitraums die Filtermembran durchdrungen hatten in weitere Boydenkammern, diejenigen Mel Im Zellen vereinzelt, welche über ein höheres invasives Potenzial verfügten. Dahingegen wurden die Zellen, welche nach Ablauf des Zeitrahmens die Membran nicht penetriert hatten, in eine getrennt durchgeführte Reihe von Boydenkammer-Versuchen eingesetzt. Dabei zeigten Zellen, welche die Membran weniger gut durchdringen konnten und somit am Ende der Versuchsreihe stets im oberen Kompartiment zurückgeblieben waren, ein insgesamt geringeres invasives Potenzial im Vergleich zur Ausgangskultur. Durch fortwährende

Propagierung der beiden auf diese Weise isolierten Subpopulationen über mehr als 40 Passagen und dabei wiederholt durchgeführte Analysen konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesen Zellen um genetisch stabile Phänotypen handelt.

Im Rahmen der miRNA Microarray-Experimente wurden die Mel Im „hi“ und „si“ Subpopulationen analysiert, um weitere Hinweise auf Metastasierungs-relevante miRNAs ableiten zu können. Beim Abgleich der miRNA Expressionsmuster beider Mel Im Derivate konnten 69 differenziell exprimierte miRNAs identifiziert werden (34 davon verstärkt und 35 davon vermindert exprimiert in der hochinvasiven Subpopulation; siehe Tab. 3-7).

<u>In hochinvasiven Mel Im Zellen verstärkt exprimierte miRNAs</u>		
<i>hsa-miR-122a</i>	<i>hsa-miR-21</i>	<i>hsa-miR-518f*</i>
<i>hsa-miR-132</i>	<i>hsa-miR-28</i>	<i>hsa-miR-523</i>
<i>hsa-miR-133a</i>	<i>hsa-miR-302c*</i>	<i>hsa-miR-526a</i>
<i>hsa-miR-133b</i>	<i>hsa-miR-30e-3p</i>	<i>hsa-miR-560</i>
<i>hsa-miR-15a</i>	<i>hsa-miR-31</i>	<i>hsa-miR-628</i>
<i>hsa-miR-15b</i>	<i>hsa-miR-362</i>	<i>hsa-miR-631</i>
<i>hsa-miR-17-3p</i>	<i>hsa-miR-373*</i>	<i>hsa-miR-659</i>
<i>hsa-miR-181b</i>	<i>hsa-miR-378</i>	<i>hsa-miR-660</i>
<i>hsa-miR-183</i>	<i>hsa-miR-425-5p</i>	<i>hsa-miR-662</i>
<i>hsa-miR-187</i>	<i>hsa-miR-489</i>	<i>hsa-miR-770-5p</i>
<i>hsa-miR-200a*</i>	<i>hsa-miR-493-3p</i>	<i>hsa-miR-99b</i>
<u>In hochinvasiven Mel Im Zellen vermindert exprimierte miRNAs</u>		
<i>hsa-miR-10a</i>	<i>hsa-miR-330</i>	<i>hsa-miR-590</i>
<i>hsa-miR-134</i>	<i>hsa-miR-331</i>	<i>hsa-miR-602</i>
<i>hsa-miR-151</i>	<i>hsa-miR-34c</i>	<i>hsa-miR-609</i>
<i>hsa-miR-152</i>	<i>hsa-miR-371</i>	<i>hsa-miR-625</i>
<i>hsa-miR-18a</i>	<i>hsa-miR-449</i>	<i>hsa-miR-629</i>
<i>hsa-miR-18a*</i>	<i>hsa-miR-484</i>	<i>hsa-miR-650</i>
<i>hsa-miR-191*</i>	<i>hsa-miR-506</i>	<i>hsa-miR-652</i>
<i>hsa-miR-204</i>	<i>hsa-miR-509</i>	<i>hsa-miR-7</i>
<i>hsa-miR-211</i>	<i>hsa-miR-510</i>	<i>hsa-miR-766</i>
<i>hsa-miR-219</i>	<i>hsa-miR-519b</i>	<i>hsa-miR-92b</i>
<i>hsa-miR-23b</i>	<i>hsa-miR-520b</i>	
<i>hsa-miR-296</i>	<i>hsa-miR-574</i>	

Tabelle 3-7: miRNAs, welche in der hoch-invasiven Mel Im Subpopulation Mel Im „hi“ gegenüber der schwach-invasiven Subpopulation Mel Im „si“ differenziell reguliert werden. Durch diesen Vergleich sollten weitere Daten über potentiell Metastasierungs-relevante miRNAs gewonnen werden.

Beim Vergleich dieser Liste mit dem Set von miRNAs, welche in der Metastasierung dereguliert erscheinen (siehe 3.3.3), konnten 3 übereinstimmend regulierte miRNAs identifiziert werden (miR-133a, miR-302c*, miR-523). Bei einem Abgleich gegen diejenigen

miRNAs, welche mit der frühen Progression assoziiert sind, konnten 9 gleichförmig regulierte miRNAs identifiziert werden (verstärkt exprimiert: miR-183, miR-200a*, miR-362, miR-378, miR-518f*, miR-560, miR-628; vermindert exprimiert: miR-23b, miR-331). Der Abgleich gegen die Liste der mit der frühen Progression assoziierten miRNAs erfolgte um zu sehen, inwiefern die untersuchten Primärtumor-Zelllinien schon eine differenzielle Expression von Metastasierungs-relevanten miRNAs und somit Veränderungen im invasiven Potenzial zeigen können.

3.3.6 Bestätigung der Fehlregulation ausgewählter miRNAs in Zelllinien und Gewebeproben mittels qRT-PCR

Zur Kontrolle der Qualität der in den Microarray Experimenten generierten miRNA Expressionsdaten wurde die Expression von sieben ausgewählten miRNAs mittels qRT-PCR bestätigt. Hierfür wurden drei unterschiedliche Melanozyten Präparationen, sowie drei Primärtumor-Zelllinien (Mel Ei, Mel Wei, Mel Juso) und drei metastatische Zelllinien (Mel Im, Mel Ju, A375) untersucht. Gleichzeitig sollte sichergestellt werden, dass die beobachteten Fehlregulationen auch *in vivo* Bestand haben und keine Zellkulturartefakte darstellen. Hierzu wurde die Expression der ausgewählten miRNAs zusätzlich in einem Panel von Gewebeproben bestimmt. Es wurden Kryogewebepräparate von vier Primärtumoren sowie von sechs Melanom-Metastasen (Lunge-, Haut-, Gehirn-, Dünndarm-, sowie zwei Lymphknotenmetastasen) in die Analysen miteinbezogen. Wie in Abbildung 3-16 dargestellt, konnten die Microarraydaten zur Expression der miRNAs miR-17-5p, miR-222, miR-181a, miR-194, miR-373 und miR-22 sowohl für die untersuchten Zelllinien, als auch für die Gewebeproben bestätigt werden (Abb. 3-16 A bis G). Für die Expression von miR-148b konnten die Ergebnisse des Microarray Experiments nicht verifiziert werden (Abb. 3-16 H). Im Folgenden werden die Gründe für die Auswahl dieser miRNAs für die Bestätigung der Microarray-Daten dargestellt.

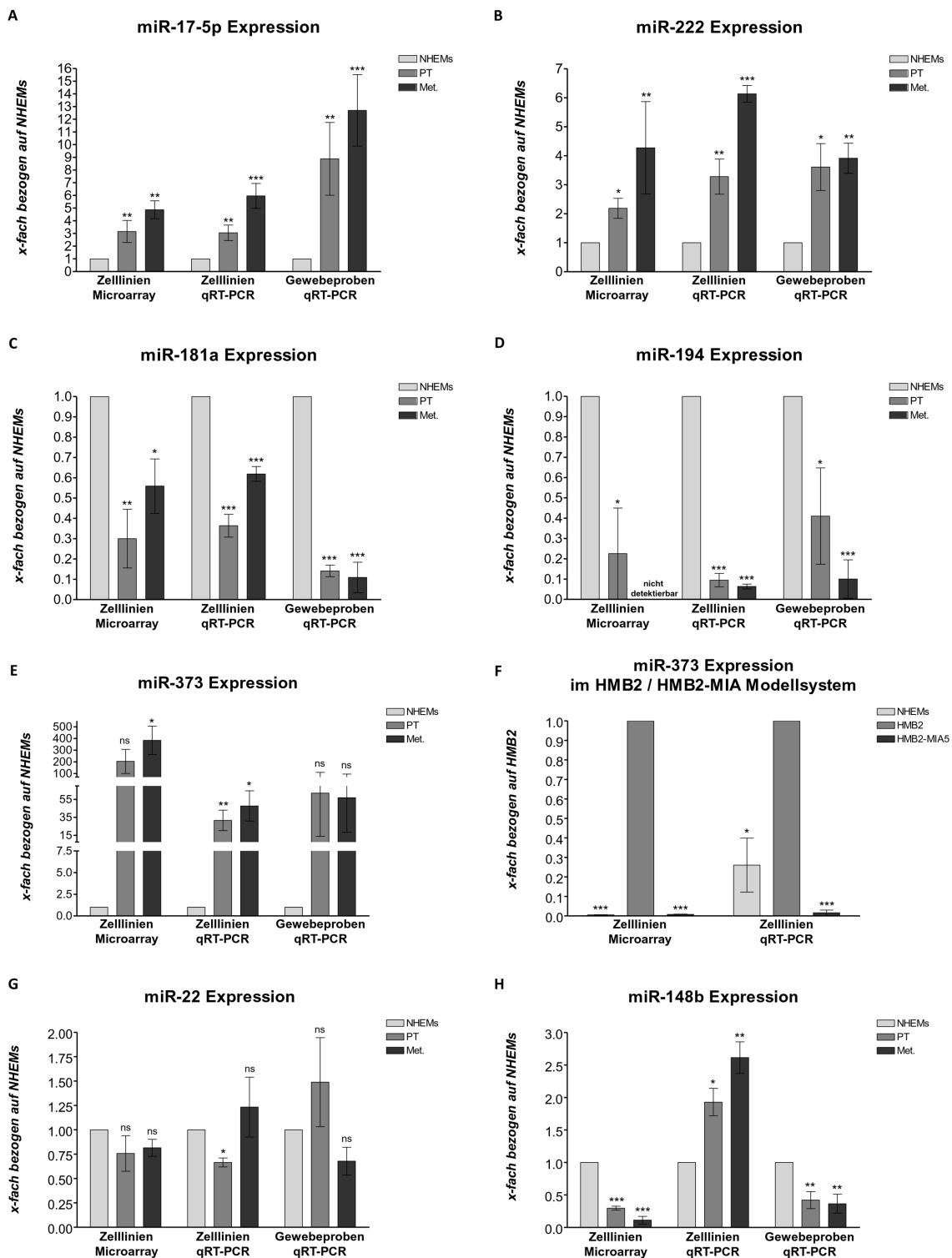


Abbildung 3-16: qRT-PCR Analyse der Expression sieben ausgewählter miRNAs in Melanomzelllinien und –gewebeproben. (Fortsetzung siehe nächste Seite)

Abbildung 3-16: qRT-PCR Analyse der Expression sieben ausgewählter miRNAs in Melanomzelllinien und –gewebeproben. (Fortsetzung) **(A bis E)** Bestätigung der im Zuge der miRNA Microarray Experimente detektierten differentiellen Expression der miRNAs miR-17-5p, miR-222, miR-181a, miR-194 und miR-373 in drei Melanozyten Präparationen, sechs Melanomzelllinien und 10 Melanomgewebeproben mittels qRT-PCR. **(F)** Bestätigung der differentiellen Regulation von miR-373 im melanozytären Modellsystem. **(G)** Die Expression von miR-22 wurde als Beispiel für eine nicht-differenziell regulierte miRNA analysiert. **(H)** Für die miRNA miR-148b konnten die Ergebnisse des Microarrays nicht bestätigt werden.

Jedes Diagramm zeigt eine Gegenüberstellung der Ergebnisse aus Microarray Experiment, qRT-PCR Analyse der Melanomzelllinien sowie qRT-PCR Analyse der Melanomgewebeproben. Für die Darstellung wurden jeweils die Mittelwerte der Expression in Melanozyten („NHEMs“; hellgraue Balken), Primärtumor-Zelllinien bzw. –Gewebe („PT“; mittelgraue Balken) und metastatischen Zelllinien bzw. Gewebe („Met.“; dunkelgraue Balken) gebildet.

Die beiden miRNAs miR-17-5p und miR-222 wurden als Beispiele für in Melanomzellen im Vergleich zu Melanozyten verstärkt exprimierte miRNAs ausgewählt. MiR-17-5p ist eine der wenigen miRNAs, zu deren Expression und zellulärer Funktion Daten in der Literatur verfügbar sind (siehe Diskussion 4.3). Die auf Ebene der miRNA Microarray Versuche festgestellte ca. 3-fach verstärkte Expression in Zelllinien aus Primärtumoren gegenüber normalen Melanozyten, sowie die weiterhin auf ca. 5-fach erhöhte Expression in metastatischen Zelllinien konnte auch auf qRT-PCR Ebene bestätigt werden (Abb. 3-16 A). Diese verstärkte Expression ist auch auf die Situation *in vivo* übertragbar, wie die Analyse der Melanomgewebeproben zeigte. Hier liegt eine ca. 9-fache (in Primärtumor-Gewebe) bzw. etwa 13-fache (in Melanom-Metastasen) Verstärkung der miR-17-5p Expression vor, wobei auch die Schwankungen zwischen den einzelnen Gewebeproben erhöht sind. Die verifizierte, gesteigerte miR-17-5p Expression in Melanomzelllinien und –gewebeproben gegenüber normalen Melanozyten stimmt mit der, für miR-17-5p bereits in B-Zell Lymphom und T-Zell Leukämie beschriebenen Funktion als onkogener miRNA (sog. OncomiR), überein (detaillierte Diskussion siehe 4.3).

Die miRNA miR-222 wird in Melanomzellen ebenfalls verstärkt exprimiert. Sie wurde als weiteres Beispiel gewählt, da die Stärke ihrer Fehlregulation unterhalb des bei der Auswertung der Microarraydaten gewählten Grenzwertes lag. Felicetti et al. analysierten diese miRNA vor kurzem im Detail und konnten dabei bereits ihre im malignen Melanom verstärkte Expression nachweisen (Felicetti et al. 2008; siehe Diskussion 4.3). Wie in Abbildung 3-16 B zu sehen, konnte die im Microarray detektierte Fehlregulation im Rahmen der qRT-PCR Analysen sowohl für die Zelllinien als auch für die Gewebeproben bestätigt werden.

Mit miR-181a und miR-194 wurden zwei im Melanom vermindert stark exprimierte miRNAs analysiert. Für miR-181a ist bereits eine Funktion als Tumorsuppressor im Gliom beschrieben (Shi et al. 2008). Für beide miRNAs konnte die in den Microarray Versuchen

detektierte verminderte Expression in Zelllinien sowie Gewebeproben bestätigt werden (siehe Abbildung 3-16 C und D).

Im Falle von miR-373 erfolgte die detaillierte Untersuchung einer miRNA, deren Expression im malignen Melanom induziert wird. Im Gegensatz zu Melanozyten, in welchen kaum miR-373 Expression detektiert werden konnte, zeigten die Melanomzelllinien im Microarray Experiment ein starkes Signal für diese miRNA (siehe auch Tab. 3-2). Dieses Ergebnis konnte mittels qRT-PCR Analysen bestätigt werden (siehe Abb. 3-16 E). Für die Gewebeproben ergab sich bezüglich dieser miRNA ein divergentes Bild: Während sowohl die Hälfte der Primärtumor-Proben als auch die Hälfte der Melanom-Metastasen in Analogie zu den Zelllinien eine starke miR-373 Expression zeigten, war in der jeweils anderen Hälfte der Proben kaum eine miR-373 Expression detektierbar. Dies spiegelt sich in der hohen Standardabweichung der den Gewebeproben zugehörigen Werte in Abbildung 3-16 E (rechter Teil des Diagramms) wieder. MiR-373 war von besonderem Interesse, da sie gleichzeitig als Beispiel für eine im HMB2/HMB2-MIA Modellsystem (siehe 1.9) deregulierte miRNA dienen konnte. Wie in Abbildung 3-16 F zu sehen, waren die Microarraydaten sowohl bezüglich der induzierten miR-373 Expression in HMB2 Zellen im Vergleich zu Melanozyten, als auch bezüglich der verminderten miR-373 Expression in dem MIA-defizienten Zellklon HMB2-MIA5 verifizierbar. Der miRNA miR-373 wird eine Funktion als OnkomiR Abschnitt zugesprochen (siehe Diskussion 4.3)

Als Beispiel für eine nicht differenziell regulierte miRNA wurde miR-22 ausgewählt. Abbildung 3-16 G zeigt die im Microarray und in qRT-PCR Analysen übereinstimmend detektierte, stabile Expression dieser miRNA sowohl in Melanomzelllinien als auch in Gewebeproben von Primärtumoren und Melanom-Metastasen.

MiR-148b sollte zu Beginn der qRT-PCR Studien als weiteres Beispiel für eine im Melanom vermindert stark exprimierte miRNA dienen. Die nachfolgenden qRT-PCR Analysen an Melanomzelllinien zeigten jedoch, dass die Expression dieser miRNA durch die Microarrays nicht richtig detektiert wurde (Abb. 3-16 H).

Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Microarray Experimente wurde eine große Anzahl miRNAs identifiziert, welche in verschiedenen Schritten der Melanom-Tumorigenese dereguliert erscheinen. Aufgabe künftiger Untersuchungen wird sein, den einzelnen miRNA Spezies die entsprechenden Zielgene zuzuordnen, um ihre zelluläre Funktion und damit auch ihre tatsächliche Relevanz in der Entstehung und Progression des malignen Melanoms aufzudecken.

3.3.7 Eine zusätzliche Anwendungsmöglichkeit der generierten miRNA Listen: Exemplarische Analyse der Regulation des Melanozyten-spezifischen Antigens RAB38

Um eine weitere Anwendungsmöglichkeit der generierten Listen deregulierter miRNAs zu untersuchen, wurde eine exemplarische Analyse der Regulation der Expression des Melanozyten-spezifischen Proteins RAB38 untersucht. RAB38, auch Melanozyten-Differenzierungs-Antigen RAB38/NY-MEL1 genannt, ist ein Mitglied der Rab small G Proteinfamilie und ist maßgeblich am intrazellulären Vesikeltransport bzw. der Reifung von Melanosomen beteiligt. Es wird spezifisch in Melanozyten exprimiert (Jäger et al. 2000; Details siehe Diskussion 4.3). Da über die Regulation der Expression von Rab38 bisher keine Daten verfügbar waren, sollten im Rahmen der hier durchgeführten, exemplarischen Analyse Hinweise auf eine potenzielle Regulation der Rab38 Expression über miRNA induziertes posttranskriptionelles Silencing gesucht werden.

Hierzu erfolgte als erster Schritt eine Analyse der Rab38 Expression sowohl auf mRNA, als auch auf Protein Ebene. Es konnte ein Verlust der Rab38 Expression im Laufe der Melanomprogression aufgezeigt werden (Abb. 3-17 A und B). Während in Primärtumoren auf Proteinebene eine bereits stark verringerte RAB38 Expression im Vergleich zu normalen humanen Melanozyten vorlag, war sie in den Melanom-Metastasen beinahe vollständig verloren. Dies galt sowohl für die analysierten Melanomgewebeproben als auch für Zelllinien, welche aus den entsprechenden Tumorstadien isoliert worden waren. Wie beim Vergleich der Abbildung 3-17 A zu Abbildung 3-17 B und C zu erkennen, korrelieren dabei mRNA-Expression und Protein Expression nicht vollständig. Während, wie bereits beschrieben, eine RAB38 Proteinexpression in Gewebeproben aus Melanom-Metastasen und den entsprechenden Zelllinien kaum nachweisbar war, konnte in diesen Proben dennoch ein relativ hoher Rab38 mRNA Spiegel detektiert werden. Dies kann als Hinweis auf eine posttranskriptionelle Regulation der Rab38 Expression, welche womöglich durch miRNA induziert sein könnte, gelten.

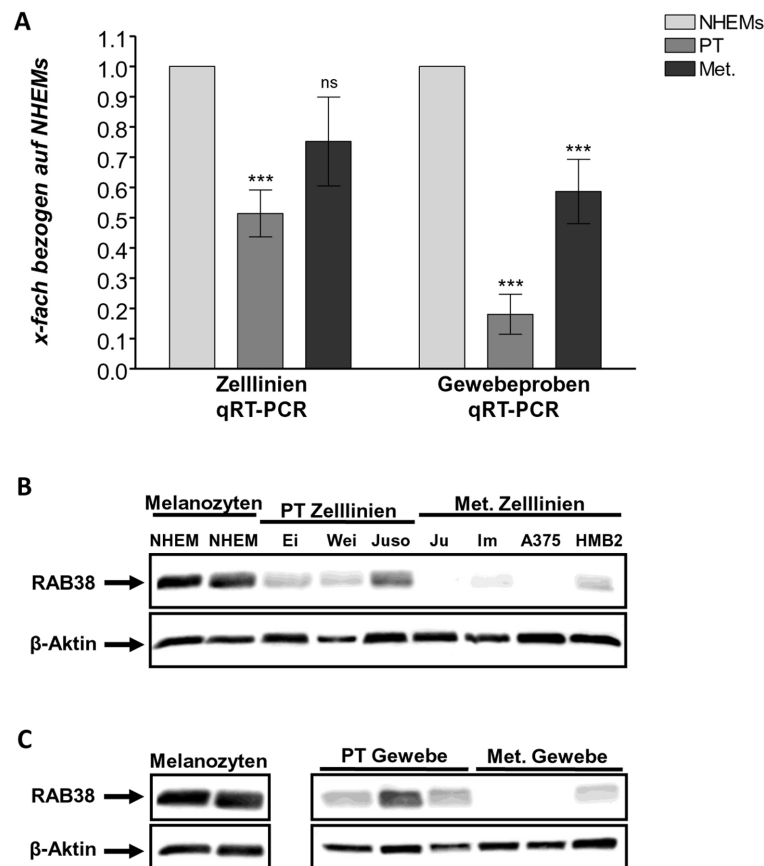


Abbildung 3-17: Analyse der Expression des potentiellen miRNA Ziels Rab38 in Melanomzelllinien und -gewebeproben. (A) Sowohl Melanomzelllinien als auch Melanomgewebeproben zeigten eine reduzierte Rab38 mRNA Expression (qRT-PCR). **(B und C)** Während in Protein-Lysaten aus Melanozyten große Mengen RAB38 detektiert werden konnten, zeigten Zelllinien und Gewebeproben aus Melanom-Primärtumoren abgeschwächte Signale mit dem anti-RAB38 Antikörper. In Zelllinien und Gewebeproben aus Melanom-Metastasen konnte kaum RAB38 Protein detektiert werden (Western Blot).

Ohne weitere Mechanismen der posttranskriptionellen Genregulation mit einzubeziehen, da nur exemplarisch eine mögliche Anwendung der generierten miRNA Listen geprüft werden sollte, wurde im nächsten Schritt mittels gebräuchlicher bioinformatischer Algorithmen nach miRNAs gesucht, welche potentiell mit Target-Sequenzen in der 3'UTR der Rab38 mRNA interagieren könnten. Diese Analyse wurde mit Hilfe der miRgen Datenbank durchgeführt (Megraw et al. 2007; Union aus allen verfügbaren Algorithmen), wobei 19 potentiell regulierend wirkende miRNA Kandidaten vorhergesagt wurden (siehe Tab. 3-8). Unter Einsatz der generierten miRNA Listen konnten 14 dieser Kandidaten ausgeschlossen werden, da sie im Vergleich von Melanomzellen zu Melanozyten nicht stark differenziell reguliert waren (in der Tabelle in grauer Schrift). Zwei weitere miRNAs, miR-181a und miR-194, können ausgeschlossen werden, da sie in Melanomzellen vermindert stark exprimiert werden und somit nicht der Hypothese entsprechen (in der Tabelle in roter Schrift; siehe auch 3.3.2). MiR-506 kam ebenfalls nicht für eine Regulation der Rab38 Expression in

Betracht, da diese miRNA während der miRNA Microarrays zwar eine verstärkte Expression in Zelllinien aus Primärtumoren zeigte, in metastatischen Zelllinien aber vermindert stark exprimiert wurde (in der Tabelle ebenfalls in roter Schrift; siehe auch 3.3.4).

Name der miRNA	Regulation im Microarray
miR-141	Gesteigerte Expression in Primärtumoren und Metastasen
miR-144	In keiner untersuchten Zelllinie exprimiert
miR-181a	Vermindert exprimiert in Primärtumoren und Metastasen
miR-181c	Gleichbleibend exprimiert
miR-194	Vermindert exprimiert in Primärtumoren und Metastasen
miR-200a	In keiner untersuchten Zelllinie exprimiert
miR-30a-5p	Nur geringfügig differenziell reguliert
miR-30b	Nur geringfügig differenziell reguliert
miR-30c	Nur geringfügig differenziell reguliert
miR-30d	Nicht differenziell reguliert
miR-30e	Nur geringfügig differenziell reguliert
miR-30e-5p	Nur geringfügig differenziell reguliert
miR-369-3p	In keiner untersuchten Zelllinie exprimiert
miR-374	Nur geringfügig differenziell reguliert
miR-410	In keiner untersuchten Zelllinie exprimiert
miR-506	Verstärkte Expression in Primärtumoren, stark verminderte Expression in Metastasen

miR-633	In keiner untersuchten Zelllinie exprimiert
miR-9	Induktion der Expression in Primärtumoren, in etwa gleichbleibendes Niveau in Metastasen
miR-99a	Nur geringfügig differenziell reguliert

Tabelle 3-8: Abgleich der für eine Interaktion mit der Rab38 3'UTR vorhergesagten miRNAs mit den Ergebnissen der miRNA Microarray Experimente. Mit Hilfe der miRgen Datenbank konnten 19 miRNAs für eine potentielle Interaktion mit Zielsequenzen in der Rab38 3'UTR vorhergesagt werden. Von diesen konnten 14 miRNAs aufgrund einer, in den Microarrays nicht-differenziell reguliert gefundenen Expression ausgeschlossen werden (graue Schrift). Drei weitere miRNAs konnten aufgrund gegenläufiger Expression ausgeschlossen werden (rote Schrift). Somit konnte die Auswahl potentieller Regulatoren für die Rab38 Expression aufgrund der generierten Microarray Daten von ursprünglich 19 auf lediglich 2 verbleibende miRNAs (grüne Schrift) eingegrenzt werden.

Unter Anwendung der im Rahmen dieser Arbeit generierten Listen Melanom-assoziiierter miRNAs konnten also 17 der 19 für die Regulation der Rab38 Expression vorhergesagten miRNAs vor Beginn der Analysen ausgeschlossen werden, wodurch für detaillierte Untersuchungen nur noch zwei miRNA Kandidaten fokussiert werden müssten (in Tabelle 3-8 in grüner Schrift). Auch wenn funktionelle Tests erst noch durchgeführt werden müssen, deutet diese Anwendungsmöglichkeit der Listen Melanom-assoziiierter miRNAs darauf hin, dass die generierten miRNA Sets die zukünftige Suche nach miRNAs, welche für melanomspezifische Gene potentiell regulatorisch wirken, deutlich effizienter machen können.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen konnten bereits veröffentlicht werden (Mueller et al. 2009).

4. Diskussion

4.1 Die Rolle der miRNA let-7a im malignen Melanom und die allgemeine Bedeutung der let-7 miRNA-Familie in der Kanzerogenese

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Regulation der Expression von Integrin beta3 in Melanomzellen auf posttranskriptioneller Ebene aufgezeigt werden. Diese beruht auf der direkten Bindung der miRNA let-7a an eine Target-Sequenz in der 3'UTR der Integrin beta3 mRNA. Versuche mit Reporter-Konstrukten, welche unterschiedlich lange Fragmente des *Integrin beta3* Promotors enthielten zeigten dabei, dass Promotor-abhängige Mechanismen bei der Regulation der Integrin beta3 Expression nur eine untergeordnete Rolle spielen, da die zelluläre Entscheidung über die Produktion des Integrin beta3 Proteins auf posttranskriptioneller Ebene durch let-7a vermittelt wird. Die Konstrukte, welche für die dabei durchgeführten Promotor-Studien verwendeten wurden, stellte Paul F. Bray (Jefferson Medical College and the Cardeza Foundation for Hematologic Research, Philadelphia, USA) zur Verfügung. Dessen Arbeitsgruppe generierte die Konstrukte zur Analyse der Integrin beta3 Regulationsmechanismen in megakaryozytischen Zelllinien (Jin et al. 1998). Zusätzlich wurde von Jin und Kollegen im Rahmen der damaligen Untersuchungen auch die Melanomzelllinie WM793 analysiert. Während in den Megakaryozyten eine klare Regulation der Integrin beta3 Expression auf transkriptioneller Ebene (vermutlich durch Bindung des Transkriptionsfaktors Sp-1 an die Position -70 im *Integrin beta3* Promotor) festgestellt werden konnte, war der Effekt in den WM793 Zellen wesentlich geringer. Deshalb merkten Jin und seine Co-Autoren bereits zum damaligen Zeitpunkt an, dass in Melanomzelllinien zusätzliche, nicht-transkriptionelle Mechanismen an der Integrin beta3 Regulation beteiligt sein könnten.

Um zu untersuchen, ob in Melanomzellen eine Regulation der Integrin beta3 Expression durch miRNA induziertes Gensilencing vorliegt, wurden mittels frei-zugänglicher Computer-Algorithmen miRNAs ermittelt, welche potentiell mit der Integrin beta3 3'UTR interagieren könnten. In experimentellen Analysen konnte nur für let-7a die, aufgrund der Funktion von miRNAs als Negativ-Regulatoren der Genexpression erforderliche, inverse Korrelation zur Integrin beta3 Expression in Melanomzelllinien und –gewebeproben gefunden werden. Der dabei festgestellte Verlust der let-7a Expression in Melanomzellen korreliert mit Berichten über stark reduzierte let-7a Expression in diversen Typen solider Tumoren (Zhang et al. 2007; Porkka et al. 2007; Gaur et al. 2007). Für den Verlust der let-7a Expression in Melanomzellen gibt es verschiedene Erklärungen, auf welche im Folgenden eingegangen werden soll.

Mögliche Ursachen für den Verlust der let-7a Expression im malignen Melanom

Die Sequenz von let-7a ist im humanen Genom an drei verschiedenen Stellen codiert. So ist let-7a-1 auf Chromosom 9q22.32, let-7a-2 auf 11q24.1 und let-7a-3 auf 22q13.31, lokalisiert. Aus LOH (loss of heterozygosity) Studien ist bekannt, dass verschiedenen Regionen des chromosomalen Locus 9q22.3 im Melanom häufig Deletionen zeigen (Bogdan et al. 2001). HOMOD (homozygosity mapping of deletion) Analysen wiederum demonstrierten in Melanومتumoren und –zelllinien eine hohe Frequenz von Deletionen in 11q24 (Goldberg et al. 2000). Somit könnten **chromosomale Aberrationen** in diesen Bereichen für den Verlust der let-7a Expression verantwortlich zeichnen.

Neben chromosomalen Abberationen kommen auch unterschiedliche regulatorische Mechanismen als Ursache für eine stark verminderte let-7a Expression in Betracht. So wurde für let-7a-3 eine Regulation durch **Methylierung einer CpG-Insel** (200bp lang; 55% GC-Gehalt) im Promotorbereich der pri-miR Sequenz durch die Methyltransferasen DNMT1 und DNMT3B (DNA (Cytosin-5)-Methyltransferase 1 und 3 beta) beschrieben (Brueckner et al. 2007). Allerdings zeigten Brueckner und Kollegen dabei, dass der let-7a-3 Locus in normalem humanen Gewebe (neben Plazenta, Gehirn, Knochenmark, Blut und Darm wurde auch gesunde Haut untersucht) stark methyliert ist. In einigen Lungenkrebsarten kommt es dann zu einer Hypomethylierung des let-7a-3 Locus, was zu einer gesteigerten Expression und tumorfördernden Wirkung der miRNA führen soll. Dementgegen stehen jedoch diverse Berichte über eine verminderte Expression und eine Tumorsuppressor-Funktion von let-7 Spezies im Lungenkrebs (Johnson et al. 2005; Takamizawa et al. 2004; Yanaihara et al. 2006). Unabhängig von der Funktion von let-7a-3 in unterschiedlichen Tumoren, kann erst dann eine Aussage über die Relevanz dieser Art der Regulation im malignen Melanom getroffen werden, wenn der Methylierungsstatus des let-7a-3 Promotors in Melanozyten und Melanomzellen ermittelt wurde, da es sich bei den verwendeten Normalhaut-Proben um eine komplexe Mischung unterschiedlicher Zelltypen handelt. Das heisst, die von Brueckner et al. in den Normalhautproben nachgewiesene Hypermethylierung des let-7a-3 Promotors muss nicht zwingend auch in Melanozyten vorliegen, da sie nur einen kleinen Teil der Zellen in der Haut ausmachen. Es ist somit nicht ausgeschlossen, dass der let-7a-3 Promotor in normalen Melanozyten nicht methyliert ist, und es in Melanomzellen zur Hypermethylierung und Stummschaltung des Gens kommt.

In einem Ansatz von Chang und Kollegen wurde eine Negativ-Regulation der Expression des let-7a-1/let-7f-1/let-7d Clusters durch **Bindung von c-Myc** (Homo sapiens v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog) an einen konservierten Promotorbereich der polycistronischen pri-miR aufgezeigt (Chang et al. 2008). Dies korreliert mit einer erhöhten c-Myc Expression in einigen Typen von Melanomzellen (Kraehn et al. 2001; Cree 2000;

Schlagbauer-Wadl et al. 1999). Chang und Co-Autoren vermuteten c-Myc als bedeutenden Regulator der Expression einer Vielzahl von miRNAs, da es zuvor bereits auch als positiver Regulator der Expression des onkogenen miR-17-92 Clusters beschrieben wurde (O'Donnell et al. 2005; siehe auch 4.3).

Eine weitere Möglichkeit zur Regulation der let-7a Expression ergibt sich aus einer Publikation von Woods und Kollegen. Sie zeigten, dass eine **stabile Aktivierung des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweges** (im Folgenden kurz MEK/ERK-Signalweg genannt) in Fibroblasten zu erhöhter Integrin beta3 Expression führt (Woods et al. 2001). Dabei konnte dieser Effekt nur durch eine konstitutive Aktivierung von Raf erzielt werden, während die transiente Aktivierung des MEK/ERK-Signalweges durch Wachstumsfaktoren und Mitogene keinen Effekt zeigte. Zudem erfolgte der Integrin beta3 Anstieg nicht mit bekannten, „frühen“ Raf-regulierten Genen, wie HB-EGF (heparin binding epidermal growth factor) und Mdm2 (murine double minute 2), sondern zeitlich verzögert. Woods und Co-Autoren vermuteten deshalb einen Zwischenschritt innerhalb dieses Mechanismus. Ob durch die im Melanom vorliegende konstitutive Aktivierung des MEK/ERK-Signalweges eine Inhibierung der let-7a Expression hervorgerufen wird, welche daraufhin zum Anstieg der Integrin beta3 Expression führt, wird Gegenstand künftiger Untersuchungen sein.

Nachweis der direkten Regulation von Integrin beta3 durch let-7a

Zusätzlich stellte sich in Anbetracht der Ergebnisse von Woods und Kollegen (siehe oben; Woods et al. 2001) für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen damit die Frage, ob der let-7a Effekt auf Integrin beta3 ein indirekter Effekt, der durch die Inhibierung der Ras-Expression vermittelt ist, sein könnte.

Der Einfluss von Ras war bereits im Vorfeld als gering einzuschätzen, da die konstitutive Aktivierung des MEK/ERK-Signalweges in Melanomen in der Regel auf aktivierenden BRAF (BRA2-associated factor) Mutationen (Davies et al. 2002; Pollock et al. 2003) bzw. Inaktivierung von RKIP (Raf Kinase Inhibitor Protein; Schuierer et al. 2004) beruhen. So liegen in 60-66% der Melanome aktivierende BRAF Mutationen vor (Davies et al. 2002). Weiterhin sprachen auch die durchgeführten Promotor-Studien gegen eine durch den MEK/ERK-Signalweg vermittelte, transkriptionelle Regulation der Integrin beta3 Expression. Dennoch wurde zusätzlich ein Knockdown von N-Ras mittels spezifischer siRNA Moleküle durchgeführt. Es zeigte sich ein kaum detektierbarer Effekt auf die Integrin beta3 Expression. Dagegen konnte die Integrin beta3 Expression vermindert werden, wenn zusammen mit den gegen N-Ras gerichteten siRNA Molekülen artifizielle let-7a pre-miR Moleküle ko-transfiziert

wurden. Dies zeigt, dass der regulatorische Einfluss von let-7a auf Integrin beta3 **unabhängig von der Regulation von N-Ras** durch let-7a ist.

Der zwingende Beweis für die Regulation von Integrin beta3 durch let-7a war das Aufzeigen einer **direkten Bindung von let-7a** an die Target-Sequenz in der 3'UTR des Integrin beta3 Transkriptes. Während das Integrin beta3 3'UTR Reporter-Konstrukt in Melanozyten, welche einen hohen endogenen let-7a Spiegel zeigen, nur sehr schwach exprimiert wurde, konnte in Melanomzellen, in welche kaum endogenes let-7a vorhanden ist, eine starke Luziferase-Aktivität gemessen werden. Dies zeigt, dass die in Melanozyten vorhandenen let-7a Moleküle an die 3'UTR des Integrin beta3 Transkriptes binden und dessen Prozessierung reprimieren, während in Melanomzellen aufgrund der Abwesenheit von let-7a Molekülen Integrin beta3 Protein entstehen kann. Während der Ko-Transfektionsexperimente von 3'UTR Reporter-Plasmid und let-7a pre- bzw. anti-miRs, war nur ein relativ geringer Effekt zu beobachten. Dies kann auf Probleme in der Etablierung einer Transfektions-Prozedur, die die gleichzeitige Transfektion von Plasmiden und kleinen RNA-Molekülen ermöglicht, zurückgeführt werden. Die verwendeten Transfektionsreagenzien waren dabei entweder auf die Transfektion großer Plasmide oder aber auf die Transfektion kleiner RNA-Moleküle ausgerichtet, wodurch eine effektive Ko-Transfektion nicht möglich war.

Durch die Mutation der let-7a Bindestelle im 3'UTR Reporter-Plasmid konnte eine Erhöhung der Luziferase-Aktivität in dem MIA-defizienten HMB2 Zellklon HMB2-MIA5, welcher eine Re-Expression von let-7a zeigt, um ca. 70% erreicht werden. Allerdings lag die Luziferase-Aktivität dabei immer noch bei nur etwa 75% der Luziferase-Aktivität des nicht-mutierten Plasmids in der parentalen HMB2 Zelllinie. Vermutlich konnte der gewählte Basenaustausch die Target-Sequenz nicht vollständig inaktivieren. Zum einen besitzen miRNAs die Fähigkeit, unter Verwendung von „wobble“ Basenpaarungen (dies sind Basenpaarungen bei RNA:RNA-Interaktionen, welche nicht den Watson-Crick Regeln folgen) an die Ziel-mRNA zu binden, was eine komplette Inaktivierung der Target-Sequenz erschwert. Zum anderen wurden die beiden auszutauschenden Nukleotide so ausgewählt, dass eine Schnittstelle für eine Endonuklease entsteht, um durch einen Kontrollverdau den Erfolg der Mutagenese kontrollieren zu können. Somit waren die Möglichkeiten bei der Auswahl der Basenaustausche begrenzt. Es ist anzunehmen, dass let-7a aufgrund der Fähigkeit zur Ausbildung von „wobble“ Basenpaarungen immer noch, wenn auch weniger effizient, an die unzureichend mutierte Target-Sequenz binden konnte.

Einfluss von let-7a auf zelluläre Funktionen von Melanomzellen

Integrin beta3 besitzt einen wesentlichen Einfluss auf das migratorische und invasive Potenzial von Melanomzellen (Johnson 1999). Deshalb sollte in funktionellen Tests analysiert werden, ob die Transfektion synthetischer let-7a Moleküle Auswirkungen auf die Invasivität von Melanomzellen zeigt. Durch Einbringen dieser exogenen let-7a Moleküle in Zellen der aus einem metastatischen Melanom isolierten Zelllinie Mel Im konnte deren invasives Potenzial um ca. 75% verringert werden. Außerdem war das Einbringen inhibitorisch wirkender let-7a anti-miR Moleküle in Melanozyten ausreichend, um diese zur Migration anzuregen. Die miRNA let-7a hat durch die Regulation der Expression von Integrin beta3 also einen wesentlichen Einfluss auf das **migratorische und invasive Potenzial** von Melanomzellen.

Durch seine Fähigkeit, die Expression von Integrin beta3 und zusätzlich die des Ras-Onkogens zu regulieren, ist let-7a ein potenter Tumorsuppressor. Bemerkenswerterweise zielt die Funktion von let-7a auf zwei unterschiedliche Bereiche der malignen Transformation von Zellen, nämlich auf die Zellproliferation und auf das migratorische Potenzial. Der Verlust von let-7a führt zu einer ungehemmten Proliferation von Zellen, da die Expression des Ras-Onkogens nicht mehr reprimiert werden kann. In Erweiterung der Ergebnisse von Johnson und Kollegen (Johnson et al. 2005) konnte dabei im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Regulation von N-Ras durch let-7a vermutlich überwiegend auf der Destabilisierung des N-Ras Transkriptes beruht. Diese Schlussfolgerung ergibt sich, da die Transfektion synthetischer let-7a Moleküle in einem verminderten N-Ras mRNA-Spiegel in den Melanomzellen resultierte. Inwiefern diese Regulation von Ras, vor dem Hintergrund aktivierender BRAF Mutationen und der Bedeutung von RKIP in Melanomzellen (siehe oben), für diese von Bedeutung ist, bleibt zu klären. Hierbei wichtiger ist, dass zum anderen durch den Verlust von let-7a auch die Expression von Integrin beta3 in Melanomzellen induziert wird, was ihnen die Fähigkeit verleiht, die Basallamina zu penetrieren, in Blut- und Lymphgefäßsysteme zu invadieren und sich so im Körper auszubreiten, was letztlich zur Metastasierung führen kann.

Weitere bekannte let-7a Zielgene

Die Rolle von let-7a als einflussreicher Tumorsuppressor wird zusätzlich durch die Regulation des **Proto-Onkogens HMGA2** (High mobility group AT hook 2; HMGI-C) unterstrichen (Lee und Dutta 2007; Park et al. 2007; Mayr et al. 2007; Hebert et al. 2007). HMGA Proteine sind Chromatin-assoziierte Nicht-Histon-Proteine. Sie binden mit Hilfe von

drei kurzen basischen Bereichen, welche „AT-hooks“ genannt werden und am Amino-terminalen Ende des Proteins liegen, innerhalb von AT-reichen Sequenzen in die kleine Rinne der DNA. Sie spielen eine Schlüsselrolle bei der Modulation der Chromatin-Struktur und können dadurch unter anderem die Funktion diverser Transkriptionsfaktoren verstärken oder abschwächen (Reeves und Nissen 1990; Thanos und Maniatis 1995). HMGA2 nimmt eine wichtige Rolle während der Embryonalentwicklung ein (Reeves 2001). In adulten Geweben ist HMGA2 in der Regel nur schwach exprimiert, jedoch kommt es in diversen benignen, mesenchymalen Tumoren und einigen Lungenkrebsarten zu einer starken Überexpression dieses Proteins, was auf eine generelle Bedeutung von HMGA2 in der Tumorentstehung schließen lässt (Melillo et al. 2001). Dabei sind unterschiedliche Mechanismen für die Überexpression von HMGA2 verantwortlich. In benignen, mesenchymalen Tumoren kommt es zu einer Translokation des Bereiches q13-15 auf Chromosom 12. Dieser trennt den für HMGA2 codierenden ORF (open reading frame) von der zugehörigen 3'UTR, welche acht putative let-7a Bindestellen enthält (Quade et al. 2003). Das im Folgenden entstehende HMGA2 Transkript kann aufgrund des Fehlens der let-7a Target-Sequenzen nicht mehr durch let-7a reprimiert werden. Dagegen ist im Lungenkrebs der **Verlust der let-7a Expression** für die induzierte HMGA2 Expression verantwortlich (Lee und Dutta, 2007). Wie bereits erwähnt, wurde mehrfach über eine starke Reduktion der let-7 Expression im Lungenkrebs berichtet (Johnson et al. 2005; Takamizawa et al. 2004; Yanaihara et al. 2006). Besonders der Verlust von let-7a-2 ist mit einer schlechten Überlebens-Prognose bei Lungenadenokarzinomen korreliert (Yanaihara et al. 2006). Der Verlust von let-7a führt in Lungenkrebszelllinien zu einer hohen Proliferationsrate, wohingegen Transfektion von synthetischen let-7a Molekülen einen Proliferationsstopp zur Folge hat. Letzterer kann durch Überexpression von HMGA2, zumindest teilweise, rückgängig gemacht werden (Lee und Dutta, 2007). Während der Verlust der let-7a Expression im Lungenkarzinom mit der Situation im malignen Melanom übereinstimmt, sind zur Expression und Bedeutung von HMGA2 im malignen Melanom bisher keine Daten verfügbar. Es ist aber bekannt, dass HMGA2 an Vorgängen der EMT, welche auch in der Tumorigenese des Melanoms eine wichtige Rolle spielt (siehe 1.8.1.2), beteiligt ist (Thuault et al. 2006). Während HMGA2 in epithelialen Zellen TGF-beta vermittelt die Expression von Slug, Snail und Twist induziert, was eine Repression der E-Cadherin Expression zur Folge hat, scheint dieser Mechanismus bei der Regulation von E-Cadherin in Melanomzellen jedoch keine Rolle zu spielen (Murakami et al. 2009). Interessanterweise wurde auch über eine Beteiligung von HMGA2 an der Regulation der MIA Expression in Adenomen der Hypophyse spekuliert (De Martino et al. 2007).

Ob let-7a über die Regulation von HMGA2 zusätzlichen Einfluss auf Melanom-relevante Mechanismen nehmen könnte, muss in weiteren Versuchen geklärt werden.

Bedeutung der let-7 miRNA-Familie in der Kanzerogenese

Eine Erklärung für die weitreichenden Auswirkungen der let-7 Spezies (also der einzelnen Mitglieder der let-7 miRNA-Familie) bei der Entstehung von Krebserkrankungen liegt in ihrer generellen Rolle als **Schlüsselregulatoren von Differenzierungsprozessen** während der Ontogenese begründet. Die let-7 miRNA-Familie (im Folgenden kurz let-7 genannt) besteht aus zwölf Mitgliedern (let-7a-1, a-2, a-3, b, c, d, e, f-1, f-2, g, i, sowie miR-98), welche auf acht verschiedenen Chromosomen codiert werden. Die Mitglieder der Familie repräsentieren neun unterschiedliche Nukleinsäuresequenzen, besitzen aber alle die gleiche „Seed“-Sequenz. Dies legt nahe, dass sich die Zielgene der einzelnen Spezies überlappen könnten. Let-7 wird im Embryo kaum exprimiert und erst spät in der Embryonalentwicklung induziert (Peter 2009). Die Zielgene von let-7a umfassen Zellzyklusregulatoren (CDC25A und CDK6; Johnson et al. 2007), Wachstums promotoren (RAS und c-Myc; Johnson et al. 2005; Sampson et al. 2007; Kumar et al. 2007) und frühe embryonale Proteine (HMGA2, Mlin-41, IMP-1) (Mayr et al. 2007; Lee und Dutta 2007; Hebert et al. 2007; Shell et al. 2007; Boyerinas et al. 2008). Damit hat die Expression von let-7 großen Einfluss auf den Differenzierungsstatus des jeweiligen Gewebes (Peter 2009). Der Verlust der let-7 Expression resultiert somit in einer reversen Embryogenese und der Dedifferenzierung von Zellen. Er wird deshalb vor allem in Zusammenhang mit der EMT und der Bildung von Krebsstammzellen diskutiert (Peter 2009). Der Verlust von let-7a könnte also zur Dedifferenzierung und EMT transformierter Melanozyten führen und somit maßgeblich an der Melanomenstehung beteiligt sein.

Nach Meister und Kollegen können Tumoren in zwei Kategorien eingeteilt werden. Typ I besitzt einen weniger differenzierten, mesenchymalen Phänotyp und repräsentiert die fortgeschrittene Krebserkrankung. Typ II zeigt einen stärker differenzierten, eher epithelialen Phänotyp und stellt die weniger fortgeschrittene Krebserkrankung dar. Entsprechend des Differenzierungsstatus der beiden Kategorien exprimiert Typ I kein let-7 mehr, während die let-7 Expression in Typ II noch vorhanden ist (Shell et al. 2007; Algeciras-Schimnich et al. 2003). Es wird davon ausgegangen, dass die let-7 Familie zusammen mit der miR-200 Familie (miR-200a und b, miR-141, miR-429) wesentlich dafür verantwortlich ist, differenzierte Zellen in ihrem differenziertem Status zu halten (Peter 2009). Dabei scheint der **Verlust von let-7 ein frühes Ereignis** in der neoplastischen Transformation zu sein, was zu einer reversen Embryogenese und der Dedifferenzierung der Tumorzellen führt. Der Verlust von miR-200 soll später in der Progression des Tumors erfolgen und das invasive Wachstum ermöglichen (Peter 2009). Unter Berücksichtigung der im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen Regulation der Integrin beta3 Expression durch let-7a könnte die Situation im malignen Melanom anders gelagert sein. Auch hier ist der Verlust der let-7a Expression

ein frühes Ereignis in der Tumorigenese, wie die Analyse von Melanom-Primärtumoren zeigte. Da dieser jedoch nicht nur zur Aktivierung proliferationsfördernder Mechanismen, sondern auch zur Induktion der Integrin beta3 Expression führt, könnte der Verlust der let-7a Expression somit eine der Ursachen für den frühen Übergang zum invasiven und metastatischen Wachstum des malignen Melanoms sein.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die let-7 miRNA-Familie durch ihre Beteiligung an Differenzierungsprozessen eine wichtige Rolle in der Entstehung von Krebserkrankungen spielt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass speziell für das maligne Melanom das Familienmitglied let-7a von besonderer Bedeutung ist, da es durch die Regulation der Integrin beta3 Expression wesentlich zum invasiven Potenzial von Melanomzellen beiträgt. Der Verlust von let-7a hat weitreichende Auswirkungen bei der Transformation von Melanozyten in Melanomzellen sowie bei der Progression von Melanomzellen zu einem invasiven Phänotyp. Das Einbringen synthetischer let-7a Moleküle führt zu einer starken Reduktion der Invasivität von Melanomzellen und könnte somit als neuartiger therapeutischer Ansatz verfolgt werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen konnten bereits publiziert werden (Mueller und Bosserhoff, 2008).

4.2 Regulation von HOX-C8 durch die miRNA miR-196a im malignen Melanom und die Bedeutung von HOX-Genen in der Tumorigenese

Desweiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Expression von HOX-C8 im malignen Melanom durch direkte Bindung der miRNA miR-196a an die 3'UTR der HOX-C8 mRNA reguliert wird. Dabei konnte in Melanomzellen eine drastische Reduktion der miR-196a Expression detektiert werden, was sowohl für die untersuchten Zelllinien, als auch für Gewebeproben aus Melanom-Primärtumoren und Metastasen gilt. Die Ursache für diese stark verminderte Expression von miR-196a wurde bisher nicht identifiziert und muss in künftigen Analysen aufgeklärt werden. Im Folgenden sollen mögliche Ursachen für die verminderte miR-196a Expression im malignen Melanom diskutiert werden.

Mögliche Ursachen für die stark verminderte Expression von miR-196a im Melanom

Die Sequenz von miR-196a ist an zwei Stellen im humanen Genom codiert. Zum einen auf Chromosom 17q21.32 (miR-196a-1) und zum anderen auf Chromosom 12q13.13 (miR-196a-2), also in den zwei paralogenen HOX-Clustern B und C. Dabei ist miR-196a-1 zwischen HOX-B9 und HOX-B13 und miR-196a-2 zwischen HOX-C9 und HOX-C10 angeordnet

(Lagos-Quintana et al. 2003; Lim et al. 2003). Allgemeine Verluste oder Deletionen dieser Regionen im malignen Melanom wurden bisher nicht aufgezeigt, sodass **chromosomale Aberrationen** als Ursache für eine generell verminderte miR-196a Expression eher unwahrscheinlich sind. Die bereits im Zusammenhang mit dem Verlust der let-7a Expression diskutierte Möglichkeit einer Hypermethylierung der Promotoren der codierenden miRNA-Gene wurden bisher nicht untersucht und werden Gegenstand künftiger Analysen sein. Ein Hinweis auf den Regulationsmechanismus, der zumindest für miR-196a-2 gelten könnte, kommt von De Martino und Kollegen (De Martino et al. 2009). Sie zeigten, dass das Chromatin-assoziierte Nicht-Histon **Protein HMGA1** die Expression mehrerer miRNAs, darunter auch der von miR-196a-2, regulieren kann (zur Funktion von HMGA Proteinen siehe 4.1). Durch Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) mit einem gegen HMGA1 gerichteten Antikörper konnten De Martino und Co-Autoren zeigen, dass HMGA1 an die Promotorregionen der entsprechenden miRNA-Gene bindet. Dabei wurde auch eine Region von 2.000bp in 5'-Richtung der miR-196a-2 Sequenz eingesetzt und die Bindung von HMGA1 an AT-reiche Sequenzen im Promotor-Bereich des miRNA-Gens bestätigt. De Martino und Kollegen konnten auch die Regulation eines Zielgens von miR-196a aufzeigen. Es handelt sich dabei um ein weiteres HMGA Protein, HMGA2 (siehe auch 4.1). Sie konnten somit miR-196a als dritte miRNA neben let-7a und miR-98 (Lee und Dutta 2007; Hebert et al. 2007; siehe 4.1) für eine Regulation von HMGA2 aufzeigen. Wie in 4.1 beschrieben, sind zur Expression und Funktion von HMGA2 im malignen Melanom bisher keine Daten verfügbar, was auch für HMGA1 zutrifft. Dadurch kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob der Verlust der miR-196a Expression im Melanom ganz oder zumindest teilweise auf eine Fehlregulation von HMGA1 zurückzuführen sein könnte.

Interaktion von miR-196a mit unterschiedlichen Target-Sequenzen in der HOX-C8 3'UTR

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass miR-196a an die HOX-C8 3'UTR bindet und somit die HOX-C8 Expression reprimiert. Die direkte Interaktion von miR-196a und HOX-C8 in HeLa Cervixkarzinom-Zellen war bereits aufgezeigt worden (Yekta et al. 2004). Hauptziel der **Untersuchungen von Yekta und Kollegen** war jedoch der Nachweis der Regulation von HOX-B8 durch miR-196a. Die miR-196a Sequenzen besitzen evolutionär konservierte, starke Komplementarität zu den Transkripten von HOX-B8, HOX-C8 und HOX-D8. Dabei besteht vor allem zwischen den Sequenzen von miR-196a und HOX-B8 mit Ausnahme einer einzigen G:U „wobble“-Paarung perfekte Komplementarität. Durch Reporter-gen-Experimente mit einem HOX-B8 3'UTR Konstrukt konnten Yekta und Co-Autoren die Repression von HOX-B8 durch direktes Binden von miR-196a an das Transkript

bestätigen. Die Repression ging mit einem Verlust der mRNA Expression einher, was auf eine Regulation durch mRNA-Destabilisierung, nicht durch Inhibierung der Translation, hinwies. Auch die 3'UTRs von HOX-C8, HOX-D8 und HOX-A7 besitzen Sequenzen mit ausgedehnter Komplementarität zu miR-196a, allerdings ist dabei keine perfekte Komplementarität wie im Falle von HOX-B8 vorhanden (Lewis et al. 2003). In Reporter-Experimenten mit Plasmiden für jede der genannten HOX 3'UTRs war eine Abnahme der Reporter-Gen-Aktivität in Anwesenheit von miR-196a zu verzeichnen. Allerdings konnte dabei keine starke Reduktion der Kopienzahl des Reporter-Gen-Transkriptes beobachtet werden (Yekta et al. 2004). Dies ließ im Falle von HOX-C8, HOX-D8 und HOX-A7 eine Repression vor allem durch Hemmung der Translation vermuten. Aus Berichten über Experimente mit Reporter-Plasmiden, welche artifizielle miRNA Bindestellen enthielten, ist bekannt, dass der Mechanismus der translationalen Inhibierung mehrere miRNA Bindestellen erfordert, diese aber dafür über eine geringere Komplementarität zur miRNA-Sequenz verfügen können (Zeng et al. 2002; Hutvagner und Zamore 2002; Doench et al. 2003; Zeng et al. 2003). Dagegen wurden Reporter-Transkripte mit perfekt komplementären Target-Sequenzen endonukleolytisch abgebaut. Die Ergebnisse von Yekta und Kollegen unterstrichen diese Beobachtungen. Yekta et al. klonierten für ihr HOX-C8 3'UTR Reporter-Plasmid ein ca. 420 Nukleotide langes Fragment der HOX-C8 3'UTR, welches zwei zur miR-196a „seed“-Sequenz komplementäre Regionen, sowie eine Region ausgedehnter Komplementarität enthielt. Eine Berechnung von miR-196a Bindestellen in der HOX-C8 3'UTR mittels des miRanda Algorithmus **im Rahmen der vorliegenden Arbeit** zeigte aber eine weitere Target-Sequenz mit hoher Komplementarität an, welche weiter 5' und somit außerhalb des von Yekta und Kollegen untersuchten Bereiches lag (siehe 3.2.2). Um die Effektivität dieser zusätzlichen Bindestelle nachzuweisen, wurde ein Reporter-Plasmid, welches nur diese miR-196a Target-Sequenz enthielt hergestellt. Während die von Yekta et al. untersuchte Target-Sequenz zwei G:U „wobble“-Paarungen enthielt, wobei eine davon in der „seed“-Sequenz lag, zeigte die im Rahmen dieser Arbeit analysierte Bindestelle perfekte Komplementarität der „seed“-Sequenz, aber niedrigere Komplementarität in der 3' Region. Die in 3.2.2 dargestellten Luziferase-Assays beweisen, dass auch die hier untersuchte, zusätzliche Bindestelle von miR-196a erkannt wird. Dabei ist ein deutlicher, aber im Vergleich zu den Beobachtungen von Yekta et al. geringerer Effekt der Repression zu erkennen. Vermutlich fungieren in der Zelle beide Bindestellen kooperativ und zeigen dann den stärksten Effekt. Dies muss in weiteren Untersuchungen zu einem späteren Zeitpunkt bestätigt werden.

Um die Bedeutung von miR-196a im malignen Melanom detailliert untersuchen zu können, wurden Melanomzellen stabil mit **miR-196a Expressionsplasmiden** transfiziert. Dabei wurde sowohl der miR-196a-1 Locus als auch der miR-196a-2 Locus getrennt voneinander kloniert. In den anschließend durchgeführten Versuchen zeigten beide Expressionsplasmide

ähnliche Effekte auf die untersuchten Zielgene. Lediglich in der Expressionsstärke der muren miR-196a konnte ein leichter Unterschied beobachtet werden. So zeigten Melanomzellen, welche mit dem miR-196a-2 Expressionsplasmid transfiziert wurden, eine stärkere miR-196a Expression, als Melanomzellen, in welche das miR-196a-1 Plasmid transfiziert wurde. Da bei der Erstellung der Plasmide unterschiedlich lange DNA-Fragmente kloniert wurden, ist dieser Effekt wohl auf die flankierenden Sequenzen zurückzuführen, welche sich auf die Effektivität der pre-miR Prozessierung auswirken könnten. Die stabil miR-196a re-exprimierenden Zellklone zeigten, wie zu erwarten, eine stark verringerte HOX-C8 Expression. Diese war im Gegensatz zu den Ergebnissen von Yekta und Kollegen bereits auf mRNA-Ebene detektierbar. Womöglich kommt es bei der kooperativen Wirkung beider miR-196a Bindestellen in der HOX-C8 3'UTR (siehe oben) zu einer Erhöhung des Anteils der mRNA-Destabilisierung an der miRNA vermittelten Repression. Diesen Effekt konnten Yekta et al. nicht aufzeigen, da sie die Expression des Reportergens, welches die verkürzte HOX-C8 3'UTR (ohne zweite Bindestelle) enthielt, auf mRNA-Ebene untersuchten. Diese Hypothese zu beweisen, wird Gegenstand künftiger Untersuchungen sein.

Bedeutung von HOX-Genen in der allgemeinen Tumorigenese und in der Progression des malignen Melanoms

Wie in der vorliegenden Arbeit dargestellt werden konnte, kommt es im malignen Melanom durch den Verlust der miR-196a Expression zur verstärkten Expression des Homeobox-Transkriptionsfaktors HOX-C8. Dabei ist, wie in 1.11.1 beschrieben, über die Rolle von HOX-Genen in der Kanzerogenese im Allgemeinen und im malignen Melanom im Speziellen, bisher nur wenig bekannt. Generell scheint die **Fehlexpression von HOX-Genen in Tumorzellen** aber einer einfachen Grundregel zu folgen (Abate-Shen 2002). Diese besagt, dass HOX-Gene, welche im Normalfall von undifferenzierten Zellen exprimiert werden, in Krebszellen induziert bzw. verstärkt exprimiert werden, während HOX-Gene, welche eigentlich in differenzierten Geweben exprimiert werden, in malignen Zellen vermindert vorliegen. Die Fehlregulation von HOX-Genen in der Kanzerogenese kann dabei in drei Kategorien eingeteilt werden. i) Das entsprechende HOX-Gen wird in einem Gewebe re-exprimiert, in welchem es normalerweise ausschließlich während der Embryonalentwicklung exprimiert wird. Diese Situation liegt im Großteil der bekannten Fälle vor und ist auch für die untersuchten Melanomzellen denkbar. ii) Die Expression eines HOX-Gens wird *de novo* in einem Gewebe, in welchem es im Normalfall nicht exprimiert wird, induziert. Dies ist eher die Ausnahme. iii) Ein HOX-Gen fällt in einem Gewebe aus, in welchem es ansonsten im adulten Zustand exprimiert wird. HOX-Gene sollten deshalb nicht als Onkogene oder Tumorsuppressor-Gene bezeichnet werden, sondern vielmehr als Tumormodulatoren, da

sich Gewebe- und Zelltyp-spezifisch sowohl die verstärkte als auch die verminderte Expression eines HOX-Gens tumorigen auswirken kann (Abate-Shen 2002). Nur wenige *bona fide* **Zielgene für HOX-Transkriptionsfaktoren** konnten bisher *in vivo* identifiziert werden. Dies liegt an den sehr promiskuitiven Bindefähigkeiten der HOX-Proteine *in vitro*, während sie *in vivo* sehr stringent ihre definierten Zielgene binden (Abate-Shen 2002). Der Großteil von Berichten über eine deregulierte Expression von HOX-Genen in Tumoren ist deshalb eher deskriptiv und beschränkt sich auf die Bestimmung von HOX-Expressionsmustern. Nur in Einzelfällen wurden der Fehlexpression bestimmter HOX-Gene Auswirkungen auf zelluläre Funktionen zugewiesen. So konnte in Postatakarzinom Zelllinien, Primärtumoren und Lymphknoten-Metastasen eine Verbindung zwischen den HOX-C Genen und der Malignität von Zellen der Prostata gefunden werden (Miller et al. 2003). Außerdem korreliert die HOX-C8 Expression in Prostatatumoren mit einem höheren Gleason Score, was einem geringeren Differenzierungs-Grad der Tumoren entspricht (Waltregny et al. 2002). Eine Überexpression von HOX-C8 kann auch im Gebärmutterhals-Karzinom (Alami et al. 1999) und in Kolorektalkarzinomen (Vider et al. 2000) beobachtet werden. Maulbecker und Kollegen präsentierten die Überexpression von HOX-Genen, darunter auch HOX-C8, als Basis für die maligne Transformation von Zellen und die Progression von Tumoren (Maulbecker und Gruss 1993). Dies weist auf eine **allgemeine Beteiligung von HOX-C8** an der Kanzerogenese hin.

Was die Fehlexpression von HOX-Genen im malignen Melanom angeht, konnten Carè und Kollegen eine verstärkte HOX-B7 Expression in 25 Melanomzelllinien, sowie in Gewebeproben von Melanom-Primärtumoren und Metastasen feststellen (Carè et al. 1996). Weiterhin detektierten Maeda und Kollegen eine verstärkte Expression von HOX-A11, HOX-A13, HOX-B9, HOX-D12 und HOX-D13 in Melanومتumoren im Vergleich zu benignen Nävi (Maeda et al. 2005). Es ist anzumerken, dass dabei weder die im Rahmen der vorliegenden Arbeit festgestellte Überexpression von HOX-C8, noch die von Carè et al. aufgezeigte Überexpression von HOX-B7 festgestellt wurde. Maeda und Co-Autoren konnten desweiteren eine erhöhte Expression von HOX-A1, HOX-A2, HOX-C4 und HOX-B13 in Melanomen, welche bereits Metastasen gebildet hatten, im Vergleich zu noch nicht metastasierten Melanomen detektierten. Deshalb vermuteten sie, dass unterschiedliche HOX-Gene an maligner Transformation bzw. Metastasierung beteiligt sein könnten. Diese Beobachtungen zeigen, dass auch im malignen Melanom eine Fehlexpression von HOX-Genen vorliegt, welche eine Rolle in der **Tumorigenese des Melanoms** spielen könnte.

Aus der zitierten Literatur kann folglich abgeleitet werden, dass HOX-C8 in diversen Tumorarten mit der malignen Transformation von Zellen und der Tumorprogression in Verbindung steht. Für das maligne Melanom lagen bislang keine Daten über eine fehlregulierte HOX-C8 Expression vor. Um mögliche Auswirkungen der im Rahmen dieser

Arbeit gefundenen verstärkten Expression von HOX-C8 in Melanomzellen auf zelluläre Funktionen zu charakterisieren, wurde eine Identifikation von Melanom-relevanten HOX-C8 Zielgenen angestrebt.

Identifikation Melanom-relevanter HOX-C8 Zielgene

Im Vorfeld wurde ein regulatorischer Zusammenhang zwischen HOX-C8 und dem **Tumorsuppressor-Protein Hugi-1** vermutet worden (siehe 3.2). Grundlage dafür waren Untersuchungen von Tomotsune und Kollegen (Tomotsune et al. 1993). Diese trugen homogenisiertes Rückenmark aus Paraformaldehyd-fixierten Mäusen auf eine HOX-C8 Antikörpersäule auf und klonierten und sequenzierten die dabei erhaltenen, immunpräzipitierten Gen-Fragmente. Einer der generierten Klone enthielt eine Sequenz aus dem Gen *mgl-1*, einem Homolog zu dem humanen Tumorsuppressor-Gen *Hugi-1*. Deshalb sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob die verstärkte Expression von HOX-C8 im malignen Melanom Ursache für den Verlust der Hugi-1 Expression (siehe 1.10; Kuphal et al. 2006) ist. Dabei zeigte sich in den stabil miR-196a re-exprimierenden Zellklonen, welche HOX-C8 stark vermindert exprimieren, keine Veränderung in der Hugi-1 Expression. Es ist anzumerken, dass die von Tomotsune et al. in Mausembryonen beobachtete, inverse Korrelation von *mgl-1* und HOX-C8 Expression nur auf bestimmte Gewebe des Embryos zutraf, während für weitere Bereiche eine Regulation durch andere HOX-Gene vermutet wurde (Tomotsune et al. 1993).

Neben Hugi-1 wurden in der Literatur einige weitere HOX-C8 Zielgene beschrieben, welche für die Tumorigenese des malignen Melanoms potentiell relevant erschienen. So identifizierten Lei und Kollegen in HOX-C8 überexprimierenden, embryonalen Maus-Fibroblasten 34 potenzielle **HOX-C8 Zielgene**, von welchen 16 verstärkt und weitere 18 vermindert exprimiert wurden (Lei et al. 2005). Der Großteil dieser Gene war in Tumor-relevante Vorgänge wie Zelladhäsion, Migration, Differenzierung und Apoptose involviert. Die stärkste Deregulation zeigte Osteopontin (Opn), welches in HOX-C8 überexprimierenden Fibroblasten stark vermindert exprimiert wurde. Zwei weitere interessante Zielgene, die im Rahmen dieser Studie genannt wurden, waren Cadherin11 (Cdh11), welches bei Überexpression von HOX-C8 verstärkt exprimiert wurde und Calponin-1 (Cnn1), welches vermindert vorlag. In nachfolgenden Analysen wurde durch Lei und Kollegen mittels Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) eine direkte Bindung von HOX-C8 unter anderem an die Promotoren von Osteopontin und Cadherin11 aufgezeigt (Lei et al. 2006). Für die vorliegende Arbeit wurden in Anlehnung an Lei und Kollegen Osteopontin, Cadherin11 und

Calponin-1 zur Untersuchung von HOX-C8 Zielgenen ausgewählt. Im Folgenden sollen diese Moleküle kurz charakterisiert werden, um die Auswahl zu begründen.

Osteopontin ist ein sekretiertes, Integrin-bindendes Glykophosphoprotein. Es interagiert mit α V β 3 Integrinen, sowie Rezeptoren der CD44 Familie und ist dadurch an der Zell-Matrix-Adhäsion und der Aktivierung unterschiedlicher Signaltransduktionswege beteiligt (Rittling und Chambers 2004; Wai und Kuo 2008). Osteopontin reguliert in Tumorzellen diverse molekulare Mechanismen, welche mit der Resistenz gegenüber Apoptosesignalen, dem Abbau und der Umformung der extrazellulären Matrix, der Zellmigration, der metastatischen Verbreitung von Tumorzellen, sowie der Neovaskularisierung von Tumoren in Verbindung stehen (Wai und Kuo 2008). Die primäre Auswirkung von Osteopontin ist die Förderung der Zelladhäsion und -migration durch ein RGD-Motiv, mit welchem es an Fibronektin und Integrine binden kann (Xuan et al. 1994; Xuan et al. 1995). Durch Bindung an Integrin β 3 aktiviert Osteopontin die ILK (integrin linked kinase), was eine Aktivierung der Promotoren von MMP-2 und uPA durch AP-1 zur Folge hat und somit zum invasiven Potenzial von Tumorzellen beiträgt (Mi et al. 2006). *In vitro* fördert Osteopontin das Wachstum verschiedener Zelltypen in Soft Agar und Suspension (Wu et al. 2000; Chang et al. 2003), verstärkt ihr invasives Potenzial (Tuck et al. 2000), induziert Proteinasen (Tuck et al. 1999; Philip et al. 2001; Das et al. 2003) und fördert die Angiogenese (Scatena et al. 1998; Leali et al. 2003).

Im malignen Melanom wird Osteopontin beim Übergang zur Gewebsinvasion exprimiert (Zhou et al. 2005). Benigne und dysplastische Nävi, sowie Melanoma *in situ* zeigen keine bis schwache Osteopontin Sekretion, während invasive und metastatische Melanome moderate bis hohe Mengen Osteopontin sekretieren. Daraus wurde gefolgert, dass im Melanom Osteopontin vermutlich eine wichtige Rolle beim Durchdringen der Basalmembran spielt, weshalb der Serumspiegel von Osteopontin im Falle des malignen Melanoms eher mit der Tumordinvasion als mit der Metastasierung verknüpft ist (Zhou et al. 2005). Dies steht im Gegensatz zu Beobachtungen in anderen Tumortypen, in welchen die Plasmakonzentration von Osteopontin als Marker für die Metastasierung gilt (Hullinger et al. 2001; Tuck et al. 1998, Tuck et al. 1997; Tuck et al. 1999; Ue et al. 1998). Mehrfach konnte in Maus-Melanommodellen eine Beteiligung von Osteopontin an der Melanomprogression und -metastasierung nachgewiesen werden (Nemoto et al. 2001; Philip et al. 2001; Geissinger et al. 2002; Hayashi et al. 2007). Osteopontin wird daher als attraktives Ziel für therapeutische Ansätze im malignen Melanom angesehen, wobei die genauen Mechanismen der sehr komplexen Regulation dieses Gens bisher noch unbekannt sind (Wai und Kuo 2008).

Cadherin11 (OB-Cadherin) ist ein Mitglied der Superfamilie der Cadherine (siehe 1.8.1). Es handelt sich um ein Typ II Cadherin, welches dennoch strukturell ähnlich zu den Typ I Cadherinen N- und P-Cadherin ist. Es wurde erstmals in Maus-Osteoblasten beschrieben

(Okazaki et al. 1994), wird aber auch in vielen Geweben mesodermaler Herkunft, wie z.B. Niere und Gehirn, exprimiert (Hoffmann und Balling 1995). In Mammakarzinom-Zellen vermittelt Cadherin11 die Bildung funktioneller adhärenter Komplexe, wobei es beta-Catenin an die Zellmembran lokalisiert (Feldes et al. 2002). Dabei wird in den Mammakarzinom-Zellen durch die Cadherin11 Expression auch der beta-Catenin Spiegel stabilisiert. Weiterhin konnte durch ektopische Expression von Cadherin11 die epitheliale Differenzierung von Zellen der Cadherin-negativen SKBR3 Mammakarzinom-Zelllinie erreicht werden, was das tumorigene Potenzial dieser Zellen wesentlich verringerte (Feldes et al. 2002). Cadherin11 ist vermutlich auch für die stabile physikalische Interaktion zwischen den Detrusormuskel-Zellen und den Myofibroblasten der Blase verantwortlich, wobei es in adhärenten Foki lokalisiert ist (Kuijpers et al. 2007). Lee und Kollegen berichten darüber, dass die Cadherin11 Expression wesentlich an der Bildung kompakter Zellverbände von Synovialfibroblasten in der Synovialmembran verantwortlich ist (Lee et al. 2007). Über die Expression oder Funktion von Cadherin11 im malignen Melanom sind in der Literatur bisher keine Daten verfügbar. Es ist aber vorstellbar, dass Cadherin11 auch hier an Adhäsionsvorgängen bzw. der Lokalisation von beta-Catenin an die Zellmembran beteiligt ist.

Calponin-1 nimmt eine Hauptrolle als stabilisierende Komponente des Zytoskelletts und als Suppressor der Remodellierung des Zytoskelletts ein (Gimona et al. 2003; Danninger und Gimona 2000). Dabei führt Calponin-1 zur Stabilisierung von Aktinfilamenten und reduziert so den Filament-Umsatz, was durch leichte Veränderungen in der 3D-Struktur der Filamente bei Bindung von Calponin-1 erreicht wird (Gimona et al. 2003; Bartegi et al. 1999). Calponin-1 wird in diversen Tumoren, wie z.B. dem Fibrosarkom, Leiomyosarkom und Osteosarkom, vermindert exprimiert (Takeoka et al. 2002; Horiuchi et al. 1998; Yamamura et al. 1998) und ist im Prostatakarzinom komplett verloren (Meehan et al. 2002). Dabei korreliert die verringerte Expression von Calponin-1 stets mit Veränderungen im Zytoskelett der malignen Zellen. Die Re-Expression von Calponin-1 verringert die Tumorigenität von Fibrosarkom-Zellen in Nacktmäusen (Takeoka et al. 2002). Weiterhin führte eine ektopische Expression von multiplen, 23 Aminosäuren langen Wiederholungen einer Calponin-ähnlichen Sequenz (CLIK genannt) in Mausmelanom-Zellen und humanen Adenokarzinomzellen zu reduzierter Zellmotilität und reduzierter Fähigkeit der Zellen zum Substrat-unabhängigen Wachstum (Lener et al. 2004). Der genaue Mechanismus der Calponin-1 Funktion ist noch nicht aufgeklärt. Auch über die Bedeutung von Calponin-1 im malignen Melanom sind bisher keine Informationen verfügbar, wobei aber auch hier eine Beteiligung dieses Proteins an der Migration von Melanomzellen vorstellbar ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression der drei untersuchten HOX-C8 Zielgene in Melanozyten und Melanomzellen in Abhängigkeit von der HOX-C8 Expression **differenziell reguliert** wurde. Interessanterweise erfolgte die Regulation dabei in

allen drei Fällen in umgekehrter Richtung zu den Beobachtungen von Lei et al. (Lei et al. 2005; Lei et al. 2006; siehe oben). So konnte in Melanomzellen, welche im Vergleich zu Melanozyten eine verstärkte HOX-C8 Expression zeigen, eine ebenfalls verstärkte Expression von Osteopontin, sowie eine verminderte Expression von Cadherin11 und Calponin-1 festgestellt werden. Die Regulation der Zielgene fand in den miR-196a re-exprimierenden Zellklonen, welche eine verminderte HOX-C8 Expression zeigten, in übereinstimmender Richtung statt. Dabei war eine verminderte Expression von Osteopontin und eine verstärkte Expression von Cadherin11 und Calponin-1 in den Zellklonen zu beobachten. Auch die in der Literatur beschriebenen zellulären Funktionen der Zielgene weisen darauf hin, dass eine Regulation der Zielgene in die festgestellte Richtung sinnvoll ist. Bisher liegen zur Regulation von HOX-C8 Zielgenen im Melanom keine weiteren Daten vor. Da Lei und Kollegen für ihre Versuche embryonale Maus-Fibroblasten verwendeten, könnte vermutet werden, dass die untersuchten Zielgene in Melanozyten und Melanomzellen über einen anderen Mechanismus von HOX-C8 reguliert werden, als in Fibroblasten. Dies wird durch die starken Gewebs- und Zelltyp-spezifischen Funktionen von HOX-Genen unterstrichen. Dabei könnten vor allem die im jeweiligen Zelltyp vorhandenen Kofaktoren eine Rolle spielen.

Mit Ausnahme von Osteopontin lagen bisher keine Daten über eine Fehlregulation der untersuchten HOX-C8 Zielgene im malignen Melanom vor. Auch über die Funktionen von Cadherin11 und Calponin-1 im Melanom sind keine Informationen verfügbar. Aufgrund der Datenlage in anderen Tumoren kann aber geschlossen werden, dass sie auch im Melanom an Prozessen der Zelladhäsion und -migration, sowie an der Signaltransduktion beteiligt sein könnten, wobei erst weitere Versuche Aufschluss über die Rolle dieser Gene in der Melanomprogression geben können.

Weitere Zielgene von miR-196a neben HOX-C8

Neben den erwähnten HOX-Genen wurde erst vor kurzem ein weiteres Zielgen für miR-196a beschrieben. Luthra und Kollegen konnten zeigen, dass miR-196a in Zelllinien aus Ösophagus-, Mamma-, und Uteruskarzinomen die Expression **Annexin A1** (ANXA1) reguliert (Luthra et al. 2008). Dabei konnten sie einen Anstieg von miR-196a und eine Abnahme der ANXA1 Expression in Gewebeproben von Adenokarzinomen des Ösophagus demonstrieren. ANXA1 ist auch als Lipocortin oder p35 bekannt und ist ein Mitglied der Kalzium- und Phospholipid-bindenden Annexin-Familie. Ursprünglich als Inhibitor der Phospholipase A2 kloniert (Wallner et al. 1986), wurde ANXA1 als wichtiger Mediator der Apoptose identifiziert (Solito et al. 2001). ANXA1 hat vielseitige Funktionen, so ist es in die

Inhibierung der Proliferation und die Regulation der Migration (Parente und Solito 2004), sowie in Membrantransport, Exozytose, Signaltransduktion, Zelldifferenzierung und Apoptose involviert (Gerke und Moss 2002). Eine verminderte Expression oder ein Verlust von ANXA1 kann in diversen Tumoren wie Prostata- (Kang et al. 2002), Mamma- (Shen et al. 2006) und Ösophaguskarzinom (Hu et al. 2004), sowie im B-Zell Lymphom (Vishwanatha et al. 2004) beobachtet werden. Dies weist ANXA1 in diesen Tumoren eine tumorsuppressive Wirkung zu. Dementsprechend fungiert miR-196a durch die Reprimierung von ANXA1 in Ösophaguszellen als Onkogen. Die Überexpression von miR-196a in diesen Zellen führt zu erhöhter Zellproliferation, erhöhter Fähigkeit der Zellen zu Substrat-unabhängigem Wachstum und unterdrückt die Apoptose (Luthra et al. 2008). Interessanterweise kann in einigen Tumorarten jedoch auch eine verstärkte Expression von ANXA1 beobachtet werden. So kommt es in Pankreaskarzinomen (Bai et al. 2004), hepatozellulären Karzinomen (Masaki et al. 1996), Gliomen (Johnson et al. 1989), und Magenkarzinomen (Sinha et al. 1998) zu einer Überexpression von ANXA1. Die Funktion von ANXA1 scheint also **Gewebs- und Zelltyp-spezifisch** sein. Dies hat zur Folge, dass auch miR-196a abhängig vom Gewebe eine Funktion als Onkogen oder Tumorsuppressor-Gen zukommen könnte. So zeigten Debernardi und Kollegen, dass der Ausfall von miR-196a in der akuten myeloiden Leukämie für eine verstärkte Expression von HOX-Genen verantwortlich ist (Debernardi et al. 2007). Die verstärkte Expression von HOX-Genen in der Leukämie wurde bereits eingehend untersucht (Thorsteinsdottir et al. 1997, 2002), wodurch miR-196a in dieser Krebserkrankung eine Rolle als Tumorsuppressor zukommen könnte. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit generierten Daten legen auch für das maligne Melanom eine Rolle von miR-196a als Tumorsuppressor nahe. Interessanterweise konnte vor kurzem gezeigt werden, dass ANXA1 in metastatischen B16B16 Mausmelanom-Zellen im Vergleich zur nicht metastatischen B16F10 Zelllinie verstärkt exprimiert wird (Rondepierre et al. 2009). Ein Knockdown der ANXA1 Expression in diesen Zellen führte zu einer signifikanten Verminderung des invasiven Potenzials in Matrigel-Invasionsassays. Rondepierre und Kollegen folgerten deshalb, dass ANXA1 eine wesentliche Rolle bei der Dissemination von Melanomzellen spielen könnte. Obwohl eine Regulation von ANXA1 durch miR-196a im malignen Melanom noch nicht bewiesen ist, könnte dies ein weiterer Mechanismus sein, durch welchen miR-196a im malignen Melanom tumorsuppressiv wirken kann.

miR-196a als Tumorsuppressor im malignen Melanom

Die Rolle von miR-196a als potenter Tumorsuppressor im malignen Melanom wird durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Vorversuche zum **Tumorstadium** der stabil miR-

196a re-exprimierenden Melanomzellklone in immundefizienten Nacktmäusen bestätigt. Es muss betont werden, dass es sich dabei um sehr preliminäre Daten handelt, welche in weiteren Versuchen mit einer größeren Anzahl von Mäusen wiederholt werden müssen, um eine signifikante statistische Auswertung vornehmen zu können. Dennoch waren die bereits in diesem kleinen Ansatz zu beobachtenden Ergebnisse sehr aufschlussreich. Die stark verzögerte Entstehung von Tumoren in Mäusen, welche die miR-196a re-exprimierenden Zellklone erhalten hatten, im Vergleich zu Mäusen, in deren Flanke Leervektor transfizierte Kontrollzellen injiziert wurden, lässt vermuten, dass miR-196a die Tumorigenität von Melanomzellen stark abschwächen kann. Erst nach Verlust des miR-196a Expressionsplasmids konnten die Melanomzellen in den Mäusen Tumoren bilden. Darauf weist auch die sehr geringe Expression von miR-196a in den präparierten Maustumoren hin, wobei auch dies noch Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein wird.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression der miRNA miR-196a im malignen Melanom stark vermindert vorliegt. Dies führt zu einem Anstieg des in normalen humanen Melanozyten durch miR-196a reprimierten Homeobox-Transkriptionsfaktors HOX-C8. Durch die verstärkte Expression von HOX-C8 werden mindestens drei weitere, Tumor-relevante Gene, nämlich Osteopontin, Cadherin11 und Calponin-1, in Melanomzellen fehlreguliert. Durch die nachgewiesene Reprimierung von HOX-C8, sowie weiterer potenzieller Zielgene kommt miR-196a im Melanom eine Rolle als potenter Tumorsuppressor zu. Dies konnte in preliminären Mausversuchen, in welchen die Re-Expression von miR-196a in Melanomzellen die Tumorbildung signifikant verzögerte, bestätigt werden.

4.3 Detektion einer großen Anzahl im Melanom fehlregulierter miRNAs durch den Vergleich der miRNA-Expressionsprofile von Melanozyten und Melanomzellen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden auf der Basis eines gut etablierten Microarray-Systems miRNA-Expressionsprofile von Melanozyten und Melanomzellen generiert. Der anschließende Abgleich der dabei erhaltenen Daten machte es möglich, eine große Anzahl von miRNAs zu identifizieren, welche mit der Entstehung und Progression des malignen Melanoms assoziiert sind.

Durch die Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurde der erste ausführlicher Abgleich des miRNA-Expressionsprofils normaler humaner Melanozyten gegen die miRNA-Expressionsprofile etablierter Melanomzelllinien vorgenommen. Vor Beginn dieser Untersuchungen konnten Daten zur globalen miRNA-Expression in Melanomzellen nur aus

größeren Studien abgeleitet werden, welche die miRNA-Expressionsprofile unterschiedlicher Tumortypen analysierten.

Verfügbare Informationen zur globalen miRNA-Expression in Melanomzellen vor Durchführung der in dieser Arbeit beschriebenen Microarray-Experimente

Die erste große Analyse der miRNA-Expressionsprofile maligner Zellen wurde von Lu und Kollegen durchgeführt. Diese untersuchten die Expression von 217 miRNAs in insgesamt 334 Zelllinien und Gewebeproben aus einer großen Anzahl unterschiedlicher Tumoren (Lu et al. 2005). In dieser bemerkenswerten Studie konnten sie aufzeigen, dass miRNA-Expressionsprofile sowohl die Gewebsherkunft als auch den Differenzierungsstatus des jeweiligen Tumors reflektieren. Desweiteren konnten sie auch Tumore, welche nur einen sehr geringen Grad an Differenzierung zeigten, aufgrund des miRNA-Expressionsprofils erfolgreich klassifizieren, während dies unter Verwendung der korrespondierenden mRNA-Expressionsprofile nicht möglich war. In der großen Anzahl der von Lu et al. untersuchten Proben waren auch drei Melanomgewebeproben, sowie zwei Melanomzelllinien beinhaltet. Da Lu und Co-Autoren keinen Abgleich der Expressionsprofile von gesunden und malignen Geweben anstrebten, wurden von ihnen keine Melanozyten oder Normalhautproben analysiert.

Zhang und Kollegen konnten durch eine breit angelegte Analyse auf Basis der Array-CGH Technologie (Comparative Genomic Hybridization) zeigen, dass eine große Anzahl von miRNA-codierenden Loci in Tumorzellen Ziel von chromosomalen Veränderungen ist (Zhang et al. 2006). Dabei befanden sich unter den 227 untersuchten Proben auch 45 Zelllinien aus Melanom-Primärtumoren. In diesen Zelllinien waren 85,9% der 283 untersuchten chromosomalen Regionen, welche für eine oder mehrere miRNAs codierten, Aberrationen unterworfen. Zhang und Co-Autoren konnten ebenfalls zeigen, dass aus diesen Aberrationen resultierende Veränderungen in der Kopienzahl von miRNA-Genen für die deregulierte Expression von miRNAs mitverantwortlich sein können. Eine Identifikation einzelner, in Melanomzellen im Vergleich zu normalen Melanozyten deregulierter miRNAs war durch diese Studie ebenfalls nicht möglich.

Auf den 59 aus unterschiedlichen Tumoren isolierten Zelllinien der NCI-60 Sammlung basierend, untersuchten Gaur und Kollegen die Expression 241 maturer miRNA-Spezies (Gaur et al. 2007). Die NCI-60 Sammlung umfasst neben Zelllinien aus Karzinomen des Gastrointestinal-Traktes, der Niere, Ovarien, Brust, Prostata, Lunge, sowie unterschiedlichen Leukämie Formen auch acht Melanomzelllinien. Gaur und Co-Autoren konnten eine Gruppe von 15 miRNAs identifizieren, deren Expressionsmuster charakteristisch für die Melanomzelllinien war und diese klar von Zelllinien aus anderen Tumoren unterschied. Im

Gegensatz zu den Zelllinien aus anderen Karzinomen, führten Gaur et al. für die Melanomzelllinien keinen Abgleich der miRNA-Expressionsprofile gegen korrespondierendes Normalgewebe durch.

Dies zeigt, dass aufgrund fehlender Vergleichsmöglichkeiten zu normaler Haut bzw. normalen Melanozyten aus den zitierten Studien kaum Informationen über, in Melanomzellen fehlregulierte miRNAs abgeleitet werden konnten. Da diese Informationen für ein allgemeines Verständnis der Bedeutung von miRNAs in der Entstehung und Progression des malignen Melanoms aber unabdingbar sind, sollten sie im Rahmen der vorliegenden Arbeit generiert werden.

Abgleich der miRNA-Expressionsprofile von Melanozyten und Melanomzelllinien

Für die Identifikation von miRNAs, welche in Melanomzellen dereguliert vorliegen, wurden miRNA-Expressionsprofile zweier unterschiedlicher Melanozyten-Präparationen, sowie von sieben gut charakterisierten Melanomzelllinien erstellt. Dabei stammten drei der Zelllinien aus primären und vier aus metastatischen Melanomen. Eine nicht-supervisierte hierarchische **Clusteranalyse**, bei welcher alle miRNAs berücksichtigt wurden, die in mindestens einer Probe exprimiert waren, trennte die Melanozyten deutlich von den Melanomzelllinien. Dagegen zeigten Letztere entgegen ihrer klar definierten Herkunft aus Primärtumoren bzw. Metastasen eine heterogene Anordnung im Melanom-Cluster. In der Vergangenheit erfolgte eine eingehende Charakterisierung der eingesetzten Melanomzelllinien bezüglich ihres invasiven Potenzials (Jacob et al. 1995; Jacob et al. 1998). Dabei zeigten die metastatischen Zelllinien im Durchschnitt eine wesentlich stärker ausgeprägte Fähigkeit, künstliche Basalmembranen zu penetrieren. Dennoch besaßen auch einige der Zelllinien aus primären Melanomen invasives Potenzial und konnten Kollagen- oder Matrigel-beschichtete Membranen durchdringen. Dementsprechend ergab ein Vergleich der MMP- und TIMP-Expression kein einheitliches Bild für die einzelnen Vertreter beider Gruppen. Zwar lag in den metastatischen Zelllinien im Mittel eine stärkere MMP und eine schwächere TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) Expression vor, doch zeigten auch einige primäre Melanomzelllinien entsprechend ihres invasiven Potenzials ähnliche Werte. Dies war auch bei der Expression von TGF-beta2 zu beobachten. Während die Konzentration dieses Wachstumsfaktors in den Überständen der metastatischen Zelllinien insgesamt wesentlich höher war, konnte bei einer der Primärtumor-Zelllinien im Zellkulturüberstand eine beinahe ebenso hohe TGF-beta2 Konzentration detektiert werden. Zusammengefasst lassen diese Studien erkennen, dass die Ergebnisse der Experimente dann den Erwartungen entsprechen, wenn man Gruppen von Zelllinien betrachtet, während

einzelne Zelllinien spezifische Veränderungen zeigen, welche nicht mit ihrer Herkunft aus Primärtumor oder Metastase korrelieren. Dabei können sogar einige primäre Zelllinien bereits metastatisches Potenzial besitzen (Jacob et al. 1995). Vermutlich ist das inhomogen erscheinende Bild der Clusteranalyse auf diese hohe Heterogenität der Melanomzelllinien zurückzuführen. Um den Einfluss Zelllinien-spezifischer Veränderungen der miRNA-Expressionsprofile in den anschließenden Analysen möglichst gering zu halten, wurden die Zelllinien für die Detektion deregulierter miRNAs deshalb entsprechend ihrer Herkunft in Gruppen zusammengefasst. Außerdem wurden miRNAs ausgeschlossen, die nur von einzelnen Melanomzelllinien exprimiert wurden.

Zur Identifikation von miRNAs, welche in der Melanomentstehung eine Rolle spielen, wurden die miRNA-Expressionsprofile von Melanozyten gegen die von Zelllinien aus Primärtumoren abgeglichen. Dabei konnte eine große Anzahl von in den Melanomzellen fehlregulierten miRNAs identifiziert werden. Interessanterweise wurde der Großteil **differenziell regulierter miRNAs** dabei in den Melanomzellen verstärkt exprimiert. Dies korreliert mit einer Studie von Volinia und Kollegen. Sie analysierten die globale miRNA-Expression in 540 Proben solider Tumoren aus Lunge, Brust, Magen, Prostata, Pankreas und Darm (Volinia et al. 2006). Dadurch konnten sie eine miRNA Signatur solider Tumoren identifizieren, welche überwiegend aus in malignen Zellen verstärkt exprimierten miRNAs bestand.

Differenzielle Expression von miRNAs in den in vitro Melanom-Modellsystemen

Um die Anzahl von miRNAs, welche in zukünftigen Experimenten näher analysiert werden sollen, eingrenzen zu können, wurden verschiedene *in vitro* Modellsysteme in die Untersuchungen eingebunden.

Wie in 1.9 beschrieben, werden in unserem Labor die **HMB2/HMB2-MIA** Zelllinien als Modellsystem, welches frühe Ereignisse in der Melanomentstehung nachvollzieht, eingesetzt. Es handelt es sich bei der Zelllinie HMB2-MIA5 um HMB2 Melanomzellen, in welchen die Expression des in der Tumorigenese des malignen Melanoms sehr bedeutenden Proteins MIA ausgeschaltet wurde (ausführliche Erklärung dieses Zellsystems in 1.9). Die MIA-defizienten Zellklone zeigen dadurch einen Phänotyp, der sich normalen Melanozyten annähert. Es handelt sich bei den HMB2-MIA5 Zellen folglich um zumindest in Teilen redifferenzierte Melanomzellen, welche aber immer noch tumorigene Eigenschaften besitzen. In früheren Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass die MIA-defizienten Zellklone in der Expression vieler Gene und Proteine eher einem melanozytären als einem Melanom-Phänotyp entsprechen (Poser et al. 2004; Tatzel et al. 2005). Dies konnte im Rahmen der vorliegenden Analysen auch für ihr miRNA-Expressionsprofil

bestätigt werden. So waren ungefähr 70% der untersuchten miRNA Spezies in Melanozyten und MIA-defizientem Zellklon HMB2-MIA5 vergleichbar stark exprimiert. Dies wird auch durch die hierarchischen Clusteranalysen betont, in welchen HMB2-MIA5 zusammen mit den Melanozyten ein deutlich von den Melanomzelllinien abgetrenntes Cluster bildet. Bei einem Abgleich der Liste von miRNAs, welche in Primärtumoren gegenüber normalen Melanozyten dereguliert erscheinen, mit der Liste von miRNAs, welche in HMB2-MIA5 gegenüber der parental Melanomzelllinie HMB2 differenziell reguliert sind, konnten 18 analog regulierte miRNAs identifiziert werden. Diese sind vermutlich mit sehr frühen Ereignissen in der Melanomentstehung assoziiert und werden in künftigen Analysen funktionell charakterisiert. Hierzu sollen unter Nutzung bereits vorhandener cDNA- und Protein-Array Daten (Poser et al. 2004; Tatzel et al. 2005) Melanom-relevante Zielgene dieser miRNAs identifiziert werden. Ein weiteres *in vitro* Modellsystem zur Analyse der frühen Melanomprogression ist das in 1.8.1.2 detailliert beschriebene **as-Snail** System. Dabei wurde in der Zelllinie Mel Im durch stabile Transfektion eines antisense-Plasmids die Expression des Transkriptionsfaktors Snail unterbunden (Poser et al. 2001; Kuphal et al. 2004; Kuphal et al. 2005). Dies führte zu einer zumindest teilweisen Revertierung der EMT von Melanomzellen. Da die Induktion von Snail und der daraus resultierende Verlust der E-Cadherin Expression früh in der Tumorigenese des malignen Melanoms auftreten, gilt das as-Snail Zellsystem als weiteres *in vitro* Modellsystem zur Untersuchung initialer Schritte der Melanomentstehung. Durch einen Abgleich der miRNA-Expressionsprofile der as-Snail Klone gegen die parentale Zelllinie Mel Im konnten miRNAs identifiziert werden, deren Expression früh in der Melanomprogression, möglicherweise durch Bindung des Transkriptionsfaktors Snail an die Promotoren der miRNA-Gene dereguliert wird. Detaillierte Analysen einiger dieser miRNAs könnten so zu einem besseren allgemeinen Verständnis der Regulation der miRNA Expression durch Transkriptionsfaktoren beitragen, sowie einen weiteren Mechanismus aufzeigen, durch welchen Snail Einfluss auf die Melanomprogression ausübt.

Bestätigung der Fehlregulation ausgewählter miRNAs im malignen Melanom

Um die Qualität der durch die miRNA-Microarrays erhaltenen Daten beurteilen zu können, wurden einige miRNAs ausgewählt, deren differenzielle Regulation durch qRT-PCR Analysen verifiziert wurde. Dabei konnte für die miRNAs miR-17-5p, miR-222, miR-181a, miR-194 und miR-373 eine Fehlexpression sowohl in Melanomzelllinien als auch – gewebeproben bestätigt werden. Im Folgenden sollen diese miRNA-Spezies und die mögliche Bedeutung ihrer Fehlregulation im Melanom kurz charakterisiert werden.

Als Beispiele für miRNAs, die in Melanomzellen stark vermindert exprimiert werden, wurden miR-181a und miR-194 ausgewählt. Für **miR-181a** wurde bereits eine Funktion als Tumorsuppressor im Gliom beschrieben (Shi et al. 2008). Dabei inhibiert miR-181a die Proliferation von Gliomzellen *in vitro*, vermindert ihre Fähigkeit zu Substrat-unabhängigem Wachstum und induziert die Apoptose. Die Zielgene, welche diese Effekte vermitteln, wurden im Rahmen der Studie von Shi und Kollegen nicht identifiziert.

Die einzigen für **miR-194** verfügbaren Daten beschreiben eine Beteiligung dieser miRNA an der Differenzierung von Epithelzellen des Verdauungstraktes (Hino et al. 2008). Dabei wird die miR-194 Expression im Rahmen von Differenzierungsprozessen intestinaler Epithelzellen induziert. Da ein geringerer Grad an Differenzierung eine wesentliche Eigenschaft von Tumorzellen ist, könnte eine verminderte miR-194 Expression somit zur Tumorprogression beitragen. Ob dies im malignen Melanom der Fall ist, bedarf weiterer Analysen.

Für **miR-373** wurden zwei unterschiedliche Mechanismen für eine Beteiligung an der Kanzerogenese beschrieben (Huang et al. 2008; Voorhoeve et al. 2006). Zum einen führt die Überexpression von miR-373 in Mammakarzinom-Zelllinien zu einem stark erhöhten migratorischen und invasiven Potenzial der Zellen, was vermutlich durch die Repression von CD44 vermittelt wird (Huang et al. 2008). Zum anderen reprimiert miR-373 den Tumorsuppressor LATS2 (large tumor suppressor 2; ein Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen) und verhindert auf diese Weise die Onkogen-induzierte Seneszenz von Keimzellen. Voorhoeve und Kollegen schlossen aus ihren Versuchen weiterhin, dass die Expression von miR-373 in adulten Zellen zu ungehemmter Proliferation führt. Durch die gleichzeitige Inhibierung der Onkogen-induzierten Seneszenz kommt es dabei zur Akkumulation von Mutationen, welche die Tumorentstehung bzw. –proliferation fördern (Voorhoeve et al. 2006). Ob diese Mechanismen auch in der Tumorigenese des malignen Melanoms eine Rolle spielen, muss in zukünftigen Experimenten geklärt werden. Interessant ist auch die Zerteilung der untersuchten Melanomgewebeproben in miR-373 stark exprimierende und miR-373 schwach exprimierende Tumoren. In weiteren Experimenten soll dabei untersucht werden, ob dieser Unterschied von diagnostischer Relevanz ist.

miR-17-5p ist Mitglied des onkogenen miR-17-92 Genclusters. Neben miR-17-5p, dessen erhöhte Expression im Melanom durch qRT-PCR bestätigt wurde, konnte in den Microarray-Experimenten auch eine verstärkte Expression der fünf weiteren Mitglieder dieses miRNA-Clusters festgestellt werden. Der Anstieg der Expression des miR-17-92 Clusters korrelierte dabei mit der Melanomprogression. Das miR-17-92 Cluster wird vom chromosomalen Locus 13q31.3 codiert, welcher in diversen soliden Tumoren und Lymphomen amplifiziert vorliegt (Ota et al. 2004; Dews et al. 2006; Hayashita et al. 2005; He et al. 2005; Volinia et al. 2006). Die Expression des Clusters wird durch Bindung von Myc an den gemeinsamen Promotor induziert (He et al. 2005; O'Donnell et al. 2005). Außerdem kann das Cluster auch durch den

Transkriptionsfaktor E2F aktiviert werden und reguliert die Expression von E2F1, was in einem negativen „Feedback-Loop“ resultiert (Petrocca et al. 2008; O'Donnell et al. 2005). Die Inhibierung von miR-17-5p durch anti-miR Moleküle induzierte Apoptose in miR-17-92 überexprimierenden Lungenkarzinom-Zelllinien (Matsubara et al. 2007). Mögliche Funktionen des onkogenen miR-17-92 Clusters im malignen Melanom wurde bisher nicht untersucht.

Relativ gut charakterisiert ist die Funktion von **miR-222** im malignen Melanom. miR-222 wird in Melanomzellen überexprimiert und hemmt die Expression des c-KIT Rezeptors und des Zellzyklusproteins p27 (Felicetti et al. 2008; Igoucheva und Alexeev 2008). Ein Knockdown von miR-222 in Melanomzellen führte zu verminderter Proliferation, sowie zu einer Verringerung des migratorischen und invasiven Potenzials. Die gesteigerte Expression von miR-222 in Melanomzellen ist auf einen Verlust des Transkriptionsfaktors PLZF (promyelocytic leukaemia zinc finger) zurückzuführen.

Mit Ausnahme von miR-222 sind über Zielgene oder mögliche Auswirkungen der als fehlreguliert bestätigten miRNAs im malignen Melanom keine Informationen verfügbar. Eine Zuordnung von Melanom-relevanten Zielgenen und zellulären Funktionen wird Gegenstand zukünftiger Untersuchung sein.

Exemplarische Analyse der Regulation des Melanozyten-spezifischen Antigens RAB38

Die exemplarische Analyse des Proteins RAB38 zeigte, dass mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit generierten Listen die Suche nach miRNAs, welches ein potentiell interessantes Zielgen regulieren könnten, sehr viel effizienter durchgeführt werden kann. Zusätzlich wurde dabei auch der Verlust der RAB38 Expression mit fortschreitender Melanomprogression aufgezeigt. Im Folgenden soll RAB38 kurz charakterisiert werden, um die mögliche Bedeutung dieses Proteins im Melanom zu definieren.

RAB38, auch als Melanozyten-Differenzierungs-Antigen RAB38/NY-MEL1 bezeichnet, ist ein Mitglied der RAB Proteinfamilie kleiner GTPasen und ist maßgeblich am intrazellulären Vesikeltransport bzw. der Reifung von Melanosomen beteiligt. Es ist in Melanozyten in perinuklearen Vesikeln lokalisiert, welche Tyrosinase und TRP-1 transportieren und sorgt für deren zielgerichtete Translokation in der Zelle. Bei Ausfall von RAB38 kann RAB32 zumindest teilweise diesen Verlust kompensieren. In Abwesenheit beider Proteine, werden die Tyrosinase Moleküle in der Zelle fehlgeleitet und es kommt zum Abbau des Enzyms nach seiner Freisetzung aus dem Trans-Golgi Netzwerk (Wasmeier et al. 2006). Vermutlich leitet RAB38 den Transport von Tyrosinase und TRP-1 vom Trans-Golgi-Netzwerk in die Melanosomen. Während in der Literatur beschrieben ist, dass RAB38 spezifisch in

Melanozyten aber auch in Melanomzelllinien exprimiert wird (Jäger et al. 2000), konnte im Rahmen dieser Arbeit ein Verlust der RAB38 Expression in Melanomzellen in Abhängigkeit von der Progression des Tumors aufgezeigt werden. Dieser Verlust war auf Proteinebene wesentlich deutlicher zu beobachten als auf mRNA Ebene. Da Jäger und Kollegen die Expression von Rab38 auf mRNA Ebene untersuchten, konnten sie den Verlust der RAB38 Expression deshalb vermutlich nicht feststellen. Desweiteren könnten die Unterschiede in der Expression von Rab38 mRNA und Protein ein Hinweis auf miRNA induziertes posttranskriptionelles Silencing sein. Ob letzteres tatsächlich vorliegt, bzw. ob es tatsächlich über eine der in vorliegender Arbeit durchgeführten exemplarischen Analyse identifizierten miRNAs die RAB38 Expression reprimiert, muss in weiteren Untersuchungen analysiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte folglich durch Abgleichen der miRNA-Expressionsprofile von Melanozyten und Melanomzellen, unter zusätzlicher Verwendung von *in vitro* Melanom-Modellsystemen, eine große Anzahl von miRNAs identifiziert werden, deren Fehlexpression mit verschiedenen Schritten der Melanomprogression assoziiert ist. Interessanterweise wurde dabei der überwiegende Teil deregulierter miRNAs in Melanomzellen verstärkt exprimiert. Außerdem waren die meisten der identifizierten miRNAs bisher nicht in Verbindung mit Prozessen der Tumorentstehung oder -progression im Allgemeinen und im malignen Melanom diskutiert worden. Weitere, funktionelle Analysen dieser miRNAs könnten neue Einsichten in die Mechanismen der Tumorigenese des malignen Melanoms ermöglichen. Die Ergebnisse dieser Studien konnten bereits veröffentlicht werden (Mueller et al. 2009).

Unter Nutzung der Ergebnisse der miRNA-Microarray Experimente sollen in zukünftigen Projekten vor allem die 18 in die frühe Melanomprogression involvierten miRNAs eingehend charakterisiert werden. Weiterhin sollen miRNAs identifiziert werden, welche als Serummarker in der Diagnostik des malignen Melanoms eingesetzt werden könnten. Ziel dieser Studien ist es, auf Basis des miRNA-Spiegels im Serum eine Unterscheidung zwischen den Frühstadien des Melanoms, sowie eine Prognose über die mögliche Metastasierung des Primärtumors treffen zu können.

5. Materialien und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Allgemeine Materialien

Abnova, Jhongli City, Taiwan

Monoklonaler anti-RAB38 Antikörper
(Klon 7F1)

Agilent, Santa Clara, USA

Human miRNA Microarray Kit (V1),
miRNA Labeling Reagent and
Hybridization Kit, Gene Expression
Wash Buffer Kit, Feature Extraction
Software 8.5

Amixa GmbH, Köln

NHEM-Neo Nucleofector Kit

Ambion, Austin, USA

mirVana™ miRNA Isolation Kit,
mirVana™ qRT-PCR miRNA
Detection Kit, mirVana qRT-PCR
Primer Sets, mirVana™ qRT-PCR
Primer Sets for Normalization (5S,
U6), Pre-miR™ miRNA (Precursor
Molecules), Anti-miR™ (miRNA
Inhibitors), Negative-control miR #1,
Negative-anti-miR

BD Biosciences, Bedford, USA

Matrigel

**BD Discovery Labware Falcon™, Boston,
USA**

Einmalartikel für Zellkultur, Poly-
styrene Round-Bottom Tubes

Behrens, Hamburg

Agar

BioRad, Richmond, USA

Immun-Blot™ PVDF Membran

**BioWhittaker Molecular Applications,
Rockland, USA**

SeaKem® LE Agarose

Braun, Frankfurt am Main

Aqua injectabile

Chemicon, Hofheim

Polyklonaler anti-Integrin beta3 Anti-
körper, sekundärer anti-Maus Anti-
körper (AP-konjugiert), sekundärer
anti-Kaninchen Antikörper (AP-
konjugiert)

Clontech, Mountain View, USA

Diverse Primer für die qRT-PCR

**Dana-Farber Cancer Institute, Boston,
USA**

TIGR MultiExperiment Viewer 4.0
Software

GraphPad Software Inc., San Diego, USA

GraphPad Prism 4.03 Software

Invitrogen, Carlsbad, USA

Lipofectamine PLUS™ Reagent,
Lipofectamine™ Reagent, RNase H,
SuperScript™ II Reverse Transcrip-
tase Kit, SeeBlue® Plus2 Protein
Standard, Ready-Load™ 100 bp und
1 kb DNA Ladder, pcDNA3 Vektor,
TOPO® TA Cloning Kit Dual Promoter

Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren

NucleoBond® Xtra Midi Plus,
NucleoSpin® RNA / Protein

Millipore, Eschborn

Einmal-Sterilfilter

Neuro Probe, Gaithersburg, USA

Polykarbonat Membranen für Boyden-
kammer (Porengröße 8µm)

New England Biolabs, Ipswich, USA

Restriktionsendonukleasen, NEBuffer
für Restriktionsenzyme, T4 DNA
Ligase, Antarktische Phosphatase

Nunc, Wiesbaden

96-Well Platten für BCA Messungen

PAN Biotech GmbH, Aidenbach	Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM), Fötales Kälberserum (FKS), Trypsin, PBS (phosphate buffered saline), Penicillin/Streptomycin
PeqLab Biotech GmbH, Erlangen	Precellys-Keramik-Kit (1,4 mm)
Pierce / Peribo Science, Bonn	BCA Protein Assay Kit
Promega, Madison, USA	Dual-Luciferase [®] Reporter Assay System, pRL-TK Vektor, pGL3-basic und pGL3-control Vektor, LacZ Vektor
PromoCell, Heidelberg	Melanocyte Growth Medium (MGM2), Melanozyten
Qiagen, Hilden	RNeasy [®] Mini Kit, QIAquick [®] Gel Extraction Kit, N-Ras siRNA #5 und #6, negative control siRNA, HiPerFect Transfektionsreagenz
Riedel de Haen, Seelze	Ethanol, Methanol
Roche Diagnostics, Mannheim	Taq [®] -DNA Polymerase, RNase A, LightCycler [®] Kapillaren, Ethidiumbromid, dN6 Primer, XTT Reagenz
Roth, Karlsruhe	Roti [®] -Load 4x denaturierend, Roti [®] -Load 4x nicht denaturierend
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	Oligonukleotide, alle nicht aufgeführten Chemikalien in p.a. Qualität
Sigma, St. Louis, USA	Acrylamid 30% Lösung und 40% Lösung, Bromphenolblau, Trypsin, BSA, TEMED, monoklonaler anti- β -Aktin Antikörper, Ampicillin, DMSO, SDS, DTT, Ethidiumbromid, IPTG, Tween-20

Stratagene, Heidelberg

Epicurian Coli[®] XL2-Blue MRF⁺ Ultra-competent Cells, QuickChange[™] Site-Directed Mutagenesis Kit

Takara Bio Inc., Shiga, Japan

SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Perfect Real Time)

VWR, Darmstadt

Kaiser's Glycerin Gelatine, Schnell-färbelösung 1, 2, 3 für Boydenkammer

Whatman International Ltd., Maidstone, England

Whatman 3MM Filterpapier, Nucleopore[®] Track-Etch Membrane

Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA

BCIP/NBT Substrate Kit

5.1.2 Geräte

Autoklaven

Tuttnauer/Systec, Wetzlar

Tischautoklav Modell 2540EL, Autoklav 2540 EK

Blotapparaturen

Whatman Biometra, Göttingen

Minigel Twin, Fastblot B34

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell

Brutschränke

Heraeus, Hanau

Zellinkubator CO₂-Auto Zero, Be-
gasungsbrutschrank BB6220, CO₂-
Inkubator HeraCell 240

Gelelektrophoreseapparaturen

BioRad, München

Wide Mini Sub[®] Cell GT

Heiz- und Kühlblöcke

Eppendorf, Hamburg

Thermomixer 5436, Thermomixer
comfort, Thermomixer compact

Mikroskope

Leica Microsystems CMS, GmbH, Bensheim

DM IL Type 090-135.001

Zeiss, Jena

Axiovert 10, ICM 405

Spannungsgeräte

Amersham Pharmacia Biotech, Little
Chalfont, England

Electrophoresis Power Supply 1001,
Electrophoresis Power Supply 301

BioRad, München

PowerPac Basic, PowerPac HC

Sterilwerkbänke

Heraeus, Hanau

LaminAir HB 2448, HeraSafe KS18

Thermocycler

MJ Research, Waltham, USA

Peltier Thermal Cycler PTC- 200

Roche Diagnostics, Mannheim

LightCycler® II

Waagen

Sartorius, Göttingen

R160P, L2200S

Zentrifugen

Eppendorf, Hamburg

Centrifuge 5810R, MiniSpin Plus

Heraeus, Hanau

Biofuge 13, Biofuge 22R, Megafuge 1.0

Kisker, Steinfurt

Tischzentrifuge

Roche Diagnostics, Mannheim

LC Carousel Centrifuge

Sonstige Geräte

Agilent, Santa Clara, USA	Microarray Scanner, Hybridisierungs- ofen, SureHyb Hybridisierungskammer
Amaga GmbH, Köln	Nucleofector® I
Bachofar, Reutlingen	UV-Transilluminator IL 350 K, 254 nm
Berthold, München	Lumat LB 9507
Bertin Technologies, Sceaux, Frankreich	PRECELLYS® 24 Homogenisator
Bühler, Edmund, Tübingen	Schüttler SM 25
Heidolph, Kehlheim	Magnetrührer MR 2000, MR 2002, Vortexer REAX 2000
IKA-Labortechnik, Staufen	Schüttler IKA-Vibrax VXR
MWG Biotech, Ebersberg	ELISA-Reader Emax, Geldoku- mentationssystem 2001i
Savant, New York, USA	Speedvac Concentrator SC 110
WTW, Weilheim	pH-Meter pH522

5.1.3 Bakterienstämme

Epicurian Coli® XL2- Blue MRF' ultrakompetente *Escherichia coli* Zellen (Stratagene, Heidelberg).

5.1.4 Säugetierzelllinien

HMB2	Humane Melanomzelllinie aus Melanommetastase
HMB2 –MIA5	Humane Melanomzelllinie HMB2, stabil transfiziert mit einem antisense MIA Konstrukt (Klon 5)
HMB2 –MIA8	Humane Melanomzelllinie HMB2, stabil transfiziert mit einem antisense MIA Konstrukt (Klon 8)
HMB2 lacZ	Humane Melanomzelllinie HMB2, stabil transfiziert mit einem β -Galaktosidase (lacZ) Expressionskonstrukt
HTZ 19d	Humane Melanomzelllinie aus Hirnmetastase
Mel Ei	Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Mel Ho	Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor (DSMZ Nr.: ACC62)
Mel Im	Humane Melanomzelllinie aus Melanommetastase
Mel Im as-Snail8	Humane Melanomzelllinie Mel Im, stabil transfiziert mit einem antisense Snail Konstrukt (Klon 8)
Mel Im as-Snail9	Humane Melanomzelllinie Mel Im, stabil transfiziert mit einem antisense Snail Konstrukt (Klon 9)
Mel Im si	<u>S</u> chwach <u>i</u> nvasive, stabile Subpopulation der Mel Im Zelllinie
Mel Im hi	<u>H</u> och <u>i</u> nvasive, stabile Subpopulation der Mel Im Zelllinie
Mel Ju	Humane Melanomzelllinie aus Melanommetastase

Mel Juso	Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor (DSMZ Nr.: ACC74)
Mel Wei	Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Melanozyten (NHEMs)	Humane primäre Melanozyten aus normaler Haut (<u>n</u> ormale <u>h</u> umane <u>e</u> pidermale <u>M</u> elanozyten)
SkMel 3	Humane Melanomzelllinie aus Lymphknotenmetastase (ATCC Nr.: HTB-69)
SkMel 28	Humane Melanomzelllinie aus Hautmetastase (ATCC Nr.: HTB-72)

5.1.5 Vektoren

pCRII TOPO

Der pCRII TOPO Vektor (Invitrogen, Carlsbad, USA) ermöglicht eine direkte Klonierung von PCR Produkten ohne Zwischenschritte. Er wird bereits linearisiert geliefert, wobei er über freie 3' Thymidin Überhänge verfügt. Da die für den Großteil der durchgeführten PCR (5.2.2.1) Reaktionen verwendete DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* über eine nicht Matrizen-abhängige terminale Transferase Aktivität verfügt, durch welche sie an das 3' Ende aller generierten PCR Produkte ein einzelnes Deoxyadenosin anfügt, wird somit ein direktes Ligieren von PCR Produkt und Vektor möglich.

pcDNA3

Der pcDNA3 Vektor (Invitrogen, Carlsbad, USA) ermöglicht unter Verwendung des CMV (*Cytomegalovirus*) Promotors eine hohe, konstitutive Expression einklonierter Gensequenzen in einer Vielzahl von Säugetierzelllinien.

miRNA Expressionskonstrukte pcDNA3_miR-196a1 und pcDNA3_miR-196a2

Zur Überexpression der beiden miRNA-196a Isoformen in Melanomzelllinien wurden die entsprechenden pre-miR codierenden Bereiche aus genomischer DNA von Melanomzellen über PCR (5.2.2.1) amplifiziert und jeweils direkt in einen pCRII TOPO Vektor (siehe oben) ligiert (miR-196a1: 376 bp, Primer hsa-miR-196a1_fwd und hsa-miR-196a1_rev; miR-196a2: 109 bp, Primer hsa-miR-196a2_fwd und hsa-miR-196a2_rev, 5.1.6.1). Aus diesem wurden sie über Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Xba*I ausgeschnitten und jeweils in einen pcDNA3 Vektor (siehe oben) eingebracht.

pGL3-basic

Der pGL3-basic Vektor (Promega, Madison, USA) enthält eine modifizierte kodierende Region für das Luziferase Gen der in Nord- und Mittelamerika verbreiteten Feuerfliege (*Photinus pyralis*), welches hinter einer multiplen Klonierungsstelle (MCS, multiple cloning site) liegt. Zur Analyse von putativen Promotorregionen können diese mittels der MCS vor das Luziferase Gen kloniert werden.

pGL3-control

Im Gegensatz zum pGL3-basic Vektor besitzt der pGL3-control Vektor (ebenfalls Promega, Madison, USA) SV40 (Simian vacuolating virus 40) Promotor und Enhancer Sequenzen, welche zu einer starken, konstitutiven Expression des Luziferase Gens in einer Vielzahl von Säugetierzellen führen.

pRL-TK

Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz bei der Durchführung von Luziferase Assays (5.2.4.5) wird der kommerziell erhältliche pRL-TK Vektor (Promega, Madison, USA) zusammen mit dem eigentlichen Reporter-Plasmid kotransfiziert. Er enthält ein modifiziertes Luziferase Gen, welches aus dem marinen Organismus *Renilla reniformis* isoliert wurde, hinter einem HSV-TK (Herpes simplex Virus Thimidinkinase) Promotor. Durch Verwendung dieses Promotors wird eine schwache bis moderate Expression der *Renilla* Luziferase in den kotransfizierten Säugetierzellen ermöglicht.

***Integrin beta3* Promotor Reporter Konstrukte ITGB3_Promoter_1159 und ITGB3_Promoter_146**

Für die *Integrin beta3* Promotor Analysen wurden Reporter-Konstrukte verwendet, die unterschiedlich lange Fragmente (ITGB3_Promoter_1159 die Region von -1159 bis zum Integrin beta3 Transkriptionsstart, ITGB3_Promoter_146 die Region von -146 bis zum Transkriptionsstart) des *Integrin beta3* Promotors in einem pGL3-basic Vektor enthalten (Jin et al., 1998). Die Vektoren wurden von Paul F. Bray (Jefferson Medical College and the Cardeza Foundation for Hematologic Research, Philadelphia, USA) zur Verfügung gestellt.

Integrin beta3 3'UTR Reporter Konstrukte ITGB3_3'UTR_631For und ITGB3_3'UTR_631For_mut

Zum Nachweis der miRNA Interaktion wurde ein 631 bp langes Fragment der Integrin beta3 3'UTR (3' untranslated region, 3' nicht-translatierter Bereich) über eine *Xba*I Schnittstelle in Sinnrichtung hinter das Luziferase Gen eines pGL3-control Vektors kloniert (verwendete Primer: ITGB3_3'UTR_fwd und ITGB3_3'UTR_rev, 5.1.6.1). Für das ITGB3_3'UTR_631For_mut Reporter Konstrukt wurde mittels Site-directed Mutagenese ein Austausch von zwei Nukleotiden innerhalb der hsa-let-7a Bindestelle vorgenommen (Mutagenese-Primer: ITGB3_3'UTR_Mut_fwd und ITGB3_3'UTR_Mut_rev, 5.1.6.1).

HOX-C8 3'UTR Reporter Konstrukt HOX-C8_3'UTR_TS1_Luc

Zum Nachweis der miRNA Interaktion wurde ein 204 bp langes Fragment der HOX-C8 3'UTR (3' untranslated region, 3' nicht-translatierter Bereich) über eine *Xba*I Schnittstelle in Sinnrichtung hinter das Luziferase Gen eines pGL3-control Vektors kloniert (verwendete Primer: HOX-C8_3'UTR_fwd2 und HOX-C8_3'UTR_TS1_rev, 5.1.6.1).

5.1.6 Oligonukleotide

5.1.6.1 Primer für Expressionsanalysen und Klonierungen

Die Oligonukleotide wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (München) bzw. Clontech (Mountain View, USA) synthetisiert. Es wurde eine 100µM Stammlösung der Oligonukleotide durch Lösen in ddH₂O hergestellt und bei –20°C gelagert. Für den Einsatz in der qRT-PCR (quantitative Real-Time PCR) wurden die entsprechenden Primer auf eine Konzentration von 20µM verdünnt.

Name des Primers	Nukleotidsequenz
β-Aktin_fwd	5'- CTA CGT GGC CCT GGA CTT CGA GC -3'
β-Aktin_rev	5'- GAT GGA GCC GCC GAT CCA CAC GG -3'
Cdh11_fwd_1501	5'- CAG ACC AAG CCA CTT TCC AAC -3'
Cdh11_rev_1658	5'- ACG CCT GCT GTG TTA TCT CG -3'
Cnn1_fwd_260	5'- ACA TCG GCA ACT TCA TCA AG -3'
Cnn1_rev_310	5'- TTG TTT CCT TTC GTC TTC GC -3'
HOX-C8_qRT_fwd_1	5'- AGG CGC AGT GGA CGG CAA AC -3'
HOX-C8_qRT_rev_85	5'- AGA GAC TTC AAT CCG ACG TTT -3'
HOX-C8_3'UTR_fwd2	5'- CAG TCT AGA GAG AAG TTT ACG ACT GTC ATT TGC -3'

HOX-C8_3'UTR_TS1_rev	5'- CAG TCT AGA GGG CAA GGA GTG AGA CAG AG -3'
hsa-miR-196a1_fwd	5'- TCT TCC GAT GTG TTG TTT AGT AG -3'
hsa-miR-196a1_rev	5'- GAC ACT TCC CAG ATC TCT TCT -3'
hsa-miR-196a2_fwd	5'- TGC TCG CTC AGC TGA TCT GT -3'
hsa-miR-196a2_rev	5'- GCC CTC GAC GAA AAC CGA C -3'
Hugl1_fwd_1219	5'- AAG CTG TGG GCC CGC ATT GTG A -3'
Hugl1_rev_1666	5'- GTC CTG GAG GAG GTC TAT GAT G -3'
ITGB3_qRT_fwd	5'- ACA CTG GCA AGG ATG CAG TGA ATT GTA C -3'
ITGB3_qRT_rev	5'- CGT GAT ATT GGT GAA GGT AGA CGT GGC -3'
ITGB3_3'UTR_fwd	5'- CAG TCT AGA ATG GTA GGA ACT GCT GGG CT -3'
ITGB3_3'UTR_rev	5'- CAG TCT AGA GCA CTT ATT CCC AGC CAA CTC -3'
ITGB3_3'UTR_Mut_fwd	5'- GCT GAT TGT ATT TAC CTT CGA GCT CTT GGC TGC CTT GTG AAG -3'
ITGB3_3'UTR_Mut_rev	5'- CTT CAC AAG GCA GCC AAG AGC TCG AAG GTA AAT ACA ATC AGC -3'
N-Ras_fwd	5'- ATG AGG ACA GGC GAA GGC T -3'

N-Ras_rev	5'- TGA GTC CCA TCA TCA CTG CTG -3'
Opn_fwd_31	5'- CTA GGC ATC ACC TGT GCC ATA CC -3'
Opn_rev_379	5'- CAG TGA CCA GTT CAT CAG ATT CAT C -3'
Rab38_fwd_97	5'- AAC TTC TCC TCG CAC TAC CG -3'
Rab38_rev_314	5'- TTC CAC TTT GCC ACT GCT TC -3'

5.1.6.2 Primer für miRNA Expressionsanalysen

Die für die qRT-PCR Analysen der miRNA Expression notwendigen spezifischen RT- und PCR Primer sowie die zugehörigen RT- und PCR Primer zur Normalisierung (5S rRNA, U6 snRNA) wurden von der Firma Ambion (Austin, USA) bezogen. Nachdem der Vertrieb der miRNA spezifischen RT- und PCR Primer von Ambion eingestellt wurde, gab die Firma einige Primer Sequenzen frei, weitere miRNA spezifische Primer konnten mittels der dadurch gewonnen Informationen selbst entworfen werden. Die Normalisierungsprimer für 5S rRNA und U6 snRNA werden weiterhin von Ambion vertrieben, die Sequenz ist nicht freigegeben.

Name des Primers	Nukleotidsequenz
miR-10a_RT	5'- CGC GCC TGC AGG TCG ACA ATT AAC CCT CAC TAA AGG GCA CAA ATT CGG AT -3'
miR-10a_PCR	5'- GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA AGA GTA CCC TGT AGA -3'
miR-141_RT	5'- CGC GCC TGC AGG TCG ACA ATT AAC CCT CAC TAA AGG GCC ATC TTT ACC AG -3'
miR-141_PCR	5'- GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA AGA GTA ACA CTG TCT -3'

miR-17-5p_RT	5'- CGC GCC TGC AGG TCG ACA ATT AAC CCT CAC TAA AGG GAC TAC CTG CAC TG -3'
miR-17-5p_PCR	5'- GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA AGA GCA AAG TGC TTA -3'
miR-181a_RT	5'- CGC GCC TGC AGG TCG ACA ATT AAC CCT CAC TAA AGG GAC TCA CCG ACA GC -3'
miR-181a_PCR	5'- GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA AGA GAA CAT TCA ACG -3'
miR-196a_RT	5'- CGC GCC TGC AGG TCG ACA ATT AAC CCT CAC TAA AGG GCC CCA ACA ACA TG -3'
miR-196a_PCR	5'- GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA AGA GTA GGT AGT TTC -3'
miR-22_RT	5'- CGC GCC TGC AGG TCG ACA ATT AAC CCT CAC TAA AGG GAC AGT TCT TCA AC -3'
miR-22_PCR	5'- GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA AGA GAA GCT GCC AGT -3'
miR-373_RT	5'- CGC GCC TGC AGG TCG ACA ATT AAC CCT CAC TAA AGG GAC ACC CCA AAA TC -3'
miR-373_PCR	5'- GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA AGA GGA AGT GCT TCG -3'

5.1.6.3 siRNA, pre-miR und anti-miR Moleküle

Die gegen N-Ras gerichteten siRNAs (small interfering RNAs) #5 und #6, sowie die zugehörige Negativ-Kontroll siRNA wurden von der Firma Qiagen (Hilden) bezogen. Die Sequenzen wurden von der Firma nicht angegeben.

Hsa-let-7a pre-miR™ Precursor Moleküle und inhibitorisch wirkende Anti-miR™ Moleküle, sowie die jeweils zugehörigen Kontrollen (Negative control miR #1 und Negativ-anti-miR) wurden von der Firma Ambion (Austin, USA) bezogen. Die Sequenzen wurden von der Firma nicht angegeben. Es ist anzumerken, dass es sich bei den, von Ambion als „pre-miRs“ bezeichneten Molekülen, nicht um pre-miRs im eigentlichen Sinne (also die Vorläufermoleküle maturer miRNAs) handelt, sondern strukturell gesehen um siRNA Moleküle, welche die Sequenz einer maturen miRNA besitzen und somit deren Wirkung nachahmen.

5.1.7 Medien, Antibiotika, Puffer und Lösungen

5.1.7.1 Medien zur Anzucht von *E.coli* und Säugetierzellkulturen

Luria Bertani Medium

10 g/l Trypton

5 g/l Hefeextrakt

10 g/l NaCl

Substanzen wurden in ddH₂O gelöst und autoklaviert

Für Platten: + 15 g/l Agar

Zur Selektion: + 100 µg/ml Ampicillin

DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium)

PAN Biotech GmbH (Aidenbach)

Zusätze: 10% (v/v) FKS

0,1% (w/v) Penicillin/Streptomycin (PS)

NHEM Medium

MGM2 (Melanocyte Growth Medium), PromoCell (Heidelberg)

Einfriermedium	50 ml DMEM (mit 10% FKS)
(pro 100 ml)	30 ml FKS
	20 ml DMSO

5.1.7.2 Antibiotika

Ampicilin-Stammlösung (500x)	50 mg/ml in ddH ₂ O (-20°C)
Geneticin- Stammlösung	100 mg/ml in ddH ₂ O (-20°C)

5.1.7.3 Puffer und Lösungen

5.1.7.3.1 Lösungen für die Plasmidisolierung aus *E. coli* (Mini-Präparation)

Lösung I	50 mM Glukose
	25 mM Tris/HCl pH 8,0
	10 mM EDTA
Lösung II	0,2 M NaOH
	1% SDS
Lösung III	60 ml KOAc (5 M)
	11,5 ml Eisessig
	28,5 ml H ₂ O

5.1.7.3.2 Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese (DNA-Auftrennung)

TAE (50x)	2 M Tris/Acetat pH 8,0 50 mM EDTA
DNA-Agarosegel	1-2% (w/v) Agarose gelöst in TAE (1x)
DNA-Gel-Ladepuffer (10x)	40% (v/v) Saccharose 0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylencyanol
Ethidiumbromidlösung	0,04% (w/v) in ddH ₂ O

5.1.7.3.3 Lösung zur Isolation von Gesamtprotein

RIPA Puffer	50 mM Tris- HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 1% (w/v) Nonidet [®] P40 0,5% (w/v) Natriumdesoxycholat 0,1% (w/v) SDS Protease Inhibitoren
--------------------	---

5.1.7.3.4 Lösungen und Gele für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Proteinauftrennung)

SDS-PAGE-Laufpuffer	25 mM Tris/HCl pH 8,5
	200 mM Glycin
	0,1% (w/v) SDS
12,5%-Trenngel	31,25% (v/v) Acrylamid:Bis 40%
	37,5% (v/v) Tris pH 8,8 (1 M)
	0,1% (v/v) SDS
	0,05% (v/v) APS
	0,05% (v/v) TEMED
4%-Sammelgel	10% (v/v) Acrylamid:Bis 40%
	12% (v/v) Tris pH 6,8 (1 M)
	0,1% (v/v) SDS
	0,05% (v/v) APS
	0,05% (v/v) TEMED

5.1.7.3.5 Lösungen für den Western Blot

Western Blot-Transferpuffer	10% (v/v) Methanol
	25 mM Tris
	190 mM Glycin
PBS (10x)	80 g/l NaCl
	2,0 g/l KCl
	14,4 g/l Na ₂ HPO ₄
	2,4 g/l KH ₂ PO ₄
	mit HCl auf pH 7,4 einstellen, autoklavieren

PBS (für die Zellkultur) PAN Biotech GmbH (Aidenbach)

5.2 Methoden

5.2.1 Allgemeine Methoden

5.2.1.1.1 Kultivierung

126

dem Flüssigmedium bzw. der Nährplatte das entsprechende Selektionsantibiotikum zugesetzt. Zum Aufbringen von Bakteriensuspensionen auf Agarplatten wurden die Bakterien mit einem sterilen Trigalsky Spatel ausplattiert, zum Animpfen von Flüssigkulturen wurde eine Kolonie mit einer sterilen Spitze von der Nährplatte gepickt. Die Inkubation von Nährplatten erfolgte über Nacht bei 37°C im Brutschrank, die Inkubation von flüssigen Kulturen auf einem Bakterenschüttler bei 37°C und 250 Upm.

5.2.1.1.2 Transformation

Zur Transformation kompetenter *E. coli* Zellen wurden je 100ng Plasmid-DNA bzw. das gesamte Volumen eines Ligationsansatzes aus einer Klonierung (5.2.2.6) zu 100µl chemisch kompetenten Zellen (5.1.3) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert und dabei gelegentlich durch leichtes Schütteln durchmischt. Anschließend wurden die Zellen für 45 bis 90 Sekunden einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt, um die Plasmidaufnahme ins Zellinnere zu erzielen. Nach dem Hitzeschock wurden die Bakterien eine Minute auf Eis abgekühlt, 500µl LB Medium zugesetzt und die Kultur 60 Minuten bei 37°C und 800 Upm im Heizblock inkubiert. Die Bakterienzellen wurden dann bei 4.000 Upm (1.200 g) in der Tischzentrifuge abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Bakterien im verbleibenden Medium resuspendiert, um eine Aufkonzentrierung zu erreichen. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf, mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum versetzten, Luria Bertani Agarplatten ausplattiert und 16 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

5.2.1.1.3 Isolierung von Plasmid DNA (Mini- und Midi-Präparation)

Die Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli* Zellen erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979; Ish-Horowicz und Burke, 1981). Kleinere Mengen Plasmid DNA (bis 5µg, Mini-Präparation) wurden wie folgt präpariert. 5ml steriles LB Medium mit Selektionsantibiotikum wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und 16 Stunden bei 37°C und 250 Upm auf dem Bakterenschüttler angezogen. Die Zellen aus 1ml der Flüssigkultur wurden pelletiert (5 Minuten bei 1.200 g) und das Bakterienpellet in 100µl Lösung I (siehe 5.1.7.3.1) resuspendiert. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurden 200µl Lösung II zugegeben, um eine Lyse der Bakterien zu erreichen. Zur Durchmischung wurde das Gefäß vorsichtig geschwenkt. Dieser Schritt ermöglichte auch die spätere Abtrennung der Plasmid-DNA von Proteinen und chromosomaler DNA: Proteine wurden durch das in Lösung II

enthaltene SDS, chromosomale DNA (nicht jedoch superhelikale Plasmid DNA) durch das alkalische Milieu, denaturiert. Anschließend wurden 150µl Lösung III zugegeben und der Ansatz 5 Minuten auf Eis inkubiert. Da denaturierte Proteine, hochmolekulare RNA, denaturierte chromosomale DNA und bakterielle Zellabbauprodukte nach Zugabe der Kaliumacetat enthaltenden Lösung III unlösliche Komplexe mit dem entstehenden Kaliumdodecylsulfat bildeten, konnten sie mittels Zentrifugation (5 Minuten, 15.000 g) aus der Lösung entfernt werden. Die im Überstand enthaltene Plasmid DNA wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 900µl reinem Ethanol gefällt. Dazu wurde der Ansatz 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend das Präzipitat 10 Minuten bei 13.000 Upm (15.000 g) abzentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde verworfen, das Plasmid DNA Pellet in der Speedvac Zentrifuge 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Nach der Trocknung wurde das Pellet in 10µl eines H₂O / RNase Mixes (120µl ddH₂O + 5µl RNase A) resuspendiert und im Heizblock bei 37°C etwa 20 Minuten bei 350 Upm geschüttelt, um störende, niedermolekulare RNA aus dem Präparat zu entfernen.

Für die Isolierung größerer Mengen Plasmid DNA (bis 250µg, Midi-Präparation) wurden 50ml steriles LB Medium mit Selektionsantibiotikum in einem Erlenmeyerkolben angesetzt, mit 50µl Bakteriensuspension aus einer Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttelinkubator herangezogen. Die eigentliche Plasmidisolierung erfolgte unter Verwendung des NucleoBond® Xtra Midi Kits von Macherey-Nagel entsprechend der beiliegenden Anleitung. Die Plasmid-DNA wurde mit 500µl Tris Puffer (5mM) eluiert und bei -20°C gelagert.

5.2.1.2 Weitere allgemeine Methoden

Herstellung von Gelatine Filtern

Die in den Migrations Assays im Boydenkammer Modell (siehe 5.2.4.6) verwendeten Polykarbonat Filter (Porengröße 8µm) wurden mit Gelatine beschichtet, um den Zellen die Adhäsion zu erleichtern. Dazu wurden die Filter in 0,5% (v/v) Essigsäure gewaschen (20 Minuten, 50°C), in einem Faltenfilter abfiltriert und zweimal mit destilliertem Wasser gespült. Anschließend wurden die Filter eine Stunde in einer Gelatine-Lösung (5mg/l) gekocht, erneut abfiltriert, einzeln auf Papier ausgelegt und eine Stunde bei 100°C getrocknet.

5.2.2 Nukleinsäure Analytik

5.2.2.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente wurde die Polymerase Kettenreaktion genutzt. Die Reaktion erfolgte in einem Volumen von 50µl unter Verwendung folgenden Reaktionsansatzes:

5 µl	10x PCR-Puffer
0,5 µl	dNTP Mix (jedes Nukleotid 10 mM)
1,0 µl	Primer forward (20 mM)
1,0 µl	Primer reverse (20 mM)
10 ng	Template-DNA
0,5 µl	Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)
ad 50 µl	ddH ₂ O

Die Reaktion wurde in einem Peltier Thermal Cycler PTC- 200 (siehe 5.1.2) mit beheizbarem Deckel durchgeführt. Nach einem ersten Denaturierungsschritt (5min bei 94°C) wurden die Ansätze folgendem Standardprogramm unterzogen: Denaturierung (45s, 94°C), Annealing (1min, **x**°C) und Elongation (**y**min, 72°C). Die optimale Annealing Temperatur (**x**) sowie die optimale Dauer des Elongationsschrittes (**y**) waren abhängig von der Nukleinsäuresequenz der verwendeten Primer, bzw. der Größe des erwarteten Produktes und wurden dementsprechend angepasst. Die Amplifizierung erfolgte über 35 Zyklen und wurde durch einen finalen Elongationsschritt (72°C für 5min) abgeschlossen.

5.2.2.2 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA Strängen durch Restriktionsendonukleasen zu analytischen Zwecken erfolgte in einem Volumen von 10µl mit etwa 0,5µg Plasmid-DNA, 5 Units des entsprechenden Enzyms und 1µl des vom Hersteller empfohlenen 10x Reaktionspuffers. Die Ansätze wurden für 1-2 Stunden bei optimaler Reaktionstemperatur der jeweiligen Restriktionsendonuklease inkubiert und anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 5.2.2.3) aufgetrennt.

5.2.2.3 Gelelektrophorese von DNA

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten für analytische Zwecke erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden 0,8 bis 2%ige Agarosegele verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 10 Volt pro Zentimeter Gel-Länge. Anschließend wurde die DNA durch Inkubation in Ethidiumbromidlösung (10 min in 0,04% (w/v) EtBr) und anschließender Anregung mittels UV-Lichts visualisiert. Die Größe der Fragmente konnte durch Verwendung verschiedener DNA-Größenstandards (100 bp bzw. 1 kb Standard, siehe 5.1.1) bestimmt werden.

5.2.2.4 Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die zu untersuchenden DNA-Fragmente wurden nach elektrophoretischer Auftrennung und Färbung in Ethidiumbromidlösung (siehe 5.1.7.3.2) unter UV-Licht mit Hilfe eines Skalpells ausgeschnitten. Die anschließende Gelextraktion erfolgte unter Verwendung eines QIAquick® Gel Extraction Kits der Firma Qiagen (Hilden) entsprechend des beiliegenden Protokolls.

5.2.2.5 Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Lösungen

Die Konzentration gelöster Nukleinsäuren wurde photometrisch durch Messung der UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Für optische Dichten < 1 gilt dabei näherungsweise folgender linearer Zusammenhang:

$$\begin{array}{ll} 1 \text{ OD}_{260\text{nm}} \text{ Einheit} = & 50\mu\text{g/ml dsDNA} \\ & 40\mu\text{g/ml RNA} \\ & 37\mu\text{g/ml ssDNA} \end{array}$$

5.2.2.6 Klonierung von DNA Fragmenten in Plasmide

Zur Herstellung von Expressionsplasmiden und Reportergenkonstrukten wurde das jeweilige DNA-Fragment (Insert) mittels PCR (5.2.2.1) aus cDNA bzw. genomischer DNA amplifiziert. Die hierbei verwendeten PCR Primer enthielten zusätzlich die Sequenz für verschiedene Restriktionsschnittstellen. Sowohl Ziel-Vektor als auch Insert-DNA wurden mit den

entsprechenden Restriktionsendonukleasen verdaut (5.2.2.2), elektrophoretisch aufgetrennt (5.2.2.3) und durch Gelextraktion (5.2.2.4) aufgereinigt. Anschließend wurden Vektor und Insert über Nacht bei 16°C in folgendem Reaktionsansatz miteinander ligiert:

2 µl	10x Ligase Puffer
0,3 bis 0,5 µg	Ziel-Vektor
3 bis 5 facher	Überschuss der Insert DNA
400 U	T4 DNA Ligase
ad 20 µl	ddH ₂ O

Die Ligationsreaktion wurde für 10 min bei 65°C hitzeinaktiviert und anschließend vollständig in ultrakompetente *E. coli* Zellen (5.1.3) transformiert (5.2.1.1.2). Die Überprüfung klonierter Sequenzen erfolgte durch Sequenzierung bei der Firma Entelechon (Regensburg).

5.2.2.7 Isolierung von RNA aus Säugetierzellen und Geweben

Die Isolierung von Gesamt-zellulärer RNA wurde mit Hilfe eines RNeasy® Mini Kit der Firma Qiagen (Hilden) oder eines NucleoSpin® RNA/Protein Kits der Firma Macherey-Nagel (Düren) durchgeführt. Konfluent wachsende Zellen wurden mit PBS gespült und anschließend mit einem Zellschaber bzw. unter Verwendung einer Trypsin/EDTA Lösung (0,05 bzw. 0,02% (w/v)) von der Oberfläche des Kulturgefäßes abgelöst. Ca. 3×10^6 Zellen wurden bei 3.000 Upm (600 g) in der Tischzentrifuge pelletiert. Die anschließende RNA-Isolierung erfolgte entsprechend der den verwendeten Kits beiliegenden Anleitungen.

Für miRNA Expressionsanalysen wurde eine fraktionierte Isolierung von kleinen und großen RNA-Spezies angestrebt. Diese erfolgte unter Verwendung eines mirVana™ miRNA Isolation Kits der Firma Ambion (Austin, USA). Das Prinzip dieses Kits beruht darauf, dass RNA-Moleküle in Abhängigkeit von ihrer Größe bei unterschiedlichen Ethanol Konzentrationen an Silika-Membranen binden. In einem ersten Säulenlauf bei geringer Ethanol Konzentration (Zugabe von 1/3 Volumen reinen Ethanols) binden hochmolekulare RNA-Spezies (im Folgenden als Total-RNA bezeichnet) an einen Glasfiberfilter, niedermolekulare RNA-Spezies mit 200 nt und darunter, wie 5S rRNA, snRNAs und auch miRNAs werden vom Filter nicht gebunden und verbleiben im Durchfluss. Dieser wird mit weiteren 2/3 Volumen reinen Ethanols versehen und auf eine zweite Silika-Membran aufgebracht. Unter diesen Bedingungen binden nun die kleinen RNA-Spezies an den Filter und können im Folgenden getrennt von größeren RNA-Molekülen eluiert werden. Es stehen somit am Ende der Prozedur zwei RNA Fraktionen zur Verfügung: Eine Total-RNA, deren

Bestandteil auch die gesamten zellulären mRNAs sind und mittels derer Gen-Expressionsanalysen durchgeführt werden können. Zum zweiten eine wässrige Lösung kleiner (< 200 nt) RNA-Spezies (LMW, Low molecular weight Fraktion), welche unter anderem die zellulären miRNAs enthält und mit welcher Analysen der miRNA Expression ermöglicht werden. Die Vorbereitung der kultivierten Zellen erfolgte wie oben beschrieben, die fraktionierte RNA-Isolierung wurde unter Beachtung der Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Zur fraktionierten Isolierung von Total-RNA und kleinen RNA-Spezies aus Gewebeproben wurden diese in einem PRECELLYS® 24 Homogenisator (Bertin Technologies, Sceaux, Frankreich), unter Verwendung eines Precellys-Keramik-Kits (Durchmesser der enthaltenen Keramik-Kügelchen 1,4 mm) in 600µl des im mirVana™ miRNA Isolation Kit enthaltenen Lysis-Puffers homogenisiert (6.500 Upm, 3 mal 25 Sekunden mit je 15 Sekunden Pause zwischen den Zyklen) und anschließend analog zur obigen Beschreibung prozessiert.

5.2.2.8 Reverse Transkription

Für das Umschreiben von mRNA in cDNA wurden pro Reaktionsansatz 500ng aus Zelllinien bzw. Gewebe isolierter (5.2.2.7) Total-RNA eingesetzt. Die Reaktion wurde in einem 20µl Ansatz durchgeführt:

4 µl	First Strand buffer (5x)
2 µl	DTT (0,1 M)
1 µl	dNTPs (jeweils 10 mM)
1 µl	dN6 Primer (random Hexamer Primer, 2 mg/ml)
1 µl	Total-RNA (500 ng/µl)
ad 20µl	mit ddH ₂ O

Der Ansatz wurde 5 Minuten bei 70°C inkubiert, um die RNA zu denaturieren. Nach Abkühlen des Ansatzes wurde 1µl (200 Units) Superscript II Reverse Transkriptase pro Reaktionsansatz zugegeben. Die reverse Transkription erfolgte bei 37°C für 60 Minuten, gefolgt von einer zehnminütigen Denaturierung des Enzyms bei 70°C. Um störende RNA aus der Lösung zu entfernen, erfolgte eine abschließende Inkubation mit RNase (1µl RNase A Lösung, 5.1.7.3.6, pro Ansatz) für 30 Minuten bei 37°C. Die entstandene cDNA wurde bei – 20°C aufbewahrt.

Die reverse Transkription von miRNAs erfolgte unter Verwendung eines mirVana™ qRT-PCR miRNA Detection Kits der Firma Ambion (Austin, USA), sowie miRNA spezifischer RT-

Primer (5.1.6.2). In getrennten Ansätzen wurde für jede Probe eine zweite RT Reaktion mit einem für das verwendete Normalisierungsmolekül (5S rRNA oder U6 snRNA) spezifischen RT Primer durchgeführt.

5.2.2.9 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Zur Quantifizierung der Expressionsstärke einer spezifischen mRNA wurde die Technik der quantitativen RT-PCR unter Verwendung des LightCycler II Systems (Roche Diagnostics) genutzt. Im Anschluss an die Reverse Transkription (5.2.2.8) wurde die quantitative RT-PCR Reaktion in folgendem 20µl Ansatz durchgeführt:

8,0 µl	ddH ₂ O
0,5 µl	Primer forward (20 µM)
0,5 µl	Primer reverse (20 µM)
10 µl	TaKaRa SYBR [®] Premix Ex Taq [™]
1,0 µl	cDNA Template (10 ng/µl)

Der Versuchsansatz wurde dabei im LightCycler II folgendem Programm unterzogen:

Initiale Denaturierung:	20°C/s auf 95°C, 30 s		1 Zyklus
3 Stufen PCR:	20°C/s auf 95°C, 10 s	}	40 Zyklen
	20°C/s auf x (55-65)°C, 10 s		
	20°C/s auf 72°C, 20 s		

Die optimale Annealing Temperatur x für das jeweilige Primer Paar wurde experimentell ermittelt. Eine Schmelzpunktanalyse sowie die Analyse der entstandenen Produkte auf 2%igen Agarosegelen stellten die Spezifität der Reaktion sicher. Zur Normalisierung wurde das Haushaltsgen β -Aktin benutzt. Die Quantifizierung der mRNA Expression erfolgte mit der zugehörigen LightCycler II Software nach Angaben des Herstellers.

Um die Expressionsstärke spezifischer miRNAs zu quantifizieren, wurde das oben genannte Protokoll abgeändert. Im Anschluss an die RT Reaktion des mirVana[™] qRT-PCR miRNA

Detection Kits (5.1.1) wurde die quantitative RT-PCR Reaktion in folgendem 20µl Ansatz durchgeführt:

8,5 µl	ddH ₂ O
0,5 µl	miRNA spezifischer PCR-Primer (bzw. 5S rRNA oder U6 snRNA Primer)
10 µl	TaKaRa SYBR [®] Premix Ex Taq [™]
1,0 µl	cDNA Template aus der miRNA RT Reaktion

Der Versuchsansatz wurde dabei im LightCycler II folgendem Programm unterzogen:

Initiale Denaturierung:	20°C/s auf 95°C, 30 s	1 Zyklus
3 Stufen PCR:	20°C/s auf 95°C, 3 s	} 50 Zyklen
	20°C/s auf x (55-65)°C, 5 s	
	20°C/s auf 72°C, 16 s	

Die optimale Annealing Temperatur **x** für den jeweiligen miRNA PCR-Primer wurde experimentell ermittelt. Eine Schmelzpunktanalyse sowie die Analyse der entstandenen Produkte auf 6%igen Polyacrylamid Gelen stellten die Spezifität der Reaktion sicher. Zur Normalisierung wurden die kleinen RNA-Spezies 5S rRNA bzw. U6 snRNA genutzt.

5.2.2.10 Prozessierung und Auswertung von miRNA Microarrays

Für die Analysen der globalen miRNA Expression in Melanozyten und Melanomzelllinien wurde das miRNA Microarray System der Firma Agilent (Santa Clara, USA), bestehend aus dem Human miRNA Microarray Kit (Version 1) und einem miRNA Labeling Reagent and Hybridization Kit, gemäß der Protokolle des Herstellers verwendet. Hierfür wurde unter Verwendung eines mirVana[™] miRNA Isolation Kits der Firma Ambion (Austin, Texas) mittels des Ein-Schritt Protokolls Gesamt-zelluläre RNA aus den entsprechenden humanen Zelllinien isoliert (es fand hier also im Gegensatz zu der unter 5.2.2.7 beschriebenen Methode keine fraktionierte RNA-Isolierung statt). Für jede Zelllinie wurden in zwei unabhängigen Replikaten 100ng Gesamt-zelluläre RNA mittels Cyanin 3-pCp fluoreszenzmarkiert und bei 55°C für 24 Stunden auf die Oligonukleotid Arrays hybridisiert. Anschließend wurden die Microarrays in einer ozonfreien Atmosphäre mehreren

Waschschritten unterzogen und in einem Agilent Microarray Scanner vermessen. Die entstandenen Aufnahmen wurden mit Hilfe der Feature Extraction Software (Version 8.5) unter Verwendung des von Agilent mitgelieferten Protokolls „miRNA-v1_95_May07“ zur Gewinnung der Rohdaten ausgewertet. Da herkömmliche Methoden zur Normalisierung von Microarray Daten auf miRNA Microarrays nur sehr begrenzt anwendbar sind, wurden nach Überprüfen der Reproduzierbarkeit zwischen den Replikaten die Rohdaten zur weiteren Auswertung verwendet. Die detaillierte Analyse der auf diese Weise prozessierten Daten wurde in Microsoft Excel 2003 (Microsoft, Redmond, USA) vorgenommen. Weitere Analysen wie das Hierarchische Clustering wurden unter Verwendung des Software Pakets TIGR MultiExperiment Viewer Version 4.0 (Dana-Farber Cancer Institute, Boston, USA; <http://www.tm4.org/mev.html>) durchgeführt.

5.2.3 Proteinanalytik

5.2.3.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten

Zur Extraktion von Gesamtprotein aus kultivierten Säugetierzellen wurden die konfluent wachsenden Zellen mit PBS gewaschen, geerntet und bei 3000 Upm (600 g) für 5 Minuten pellettiert. Nach Waschen in 1ml PBS und erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 200µl RIPA Puffer (für ca. 3×10^6 Zellen; siehe Kapitel 5.1.7.3.3) gelöst. Die Präparationen wurden 15 Minuten bei 4°C und 850 rpm geschüttelt, anschließend wurde der Zelldebris durch eine zehnminütige Zentrifugation bei 4°C und 13.000 Upm (15.000 g) von den gelösten Proteinen abgetrennt. Der Proteinextrakt wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und bei –20°C gelagert.

Zur Herstellung von Gesamtproteinextrakten aus Geweben wurden diese mit dem PRECELLYS® 24 Homogenisator (Bertin Technologies, Sceaux, Frankreich), unter Verwendung eines Precellys-Keramik-Kits (Durchmesser der enthaltenen Keramik-Kügelchen 1,4 mm) in 400µl RIPA-Puffer homogenisiert (6.500 Upm, 3 mal 25 Sekunden mit je 15 Sekunden Pause zwischen den Zyklen) und anschließend analog zur Extraktion von Gesamtprotein aus kultivierten Zellen prozessiert.

5.2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen in wässrigen Lösungen erfolgte unter Verwendung eines BCA-Protein-Assay Kits der Firma Pierce (Pierce/Peribo Science, Bonn), nach der von Smith et al. 1985 beschriebenen Methode. Diese basiert auf der, durch die Peptidbindungen in Proteinen vermittelten alkalischen Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ (Biuret Reaktion), welches mit Bicinchonsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex bildet. Durch photometrische Messung bei 562nm kann die Proteinkonzentration quantifiziert werden, da sie in einem definierten Bereich linear zur Intensität der Färbung und somit zur gemessenen Absorption ist.

Für jedes Proteinextrakt erfolgte die Bestimmung der Konzentration im Doppelansatz. Zu je 5µl Proteinlösung wurden 200µl alkalische BCA-Kupfer(II) Lösung (50 Teile Lösung A mit einem Teil Lösung B) in das Well einer 96-Well Platte gegeben. Die Platte wurde bis zur Entwicklung der violetten Färbung (ca. 20 Minuten) bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Messung der Absorption bei 562nm erfolgte in einem ELISA-Reader (MWG Biotech, Ebersberg). Durch parallele Quantifizierung der Proteinkonzentration in Verdünnungen einer BSA (bovine serum albumin) Lösung bekannter Konzentration konnte die in den Proteinextrakten enthaltene Proteinmenge bestimmt werden.

5.2.3.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht. Soweit nicht gesondert angegeben, wurden pro Spur 35µg Gesamtproteinextrakt in 1x Roti-Load Auftragspuffer für 10 Minuten bei 70°C aufgekocht und anschließend bei einer Stromstärke von 0,8mA pro cm^2 Gelfläche auf 8 bis 12%igen Polyacrylamid Gelen (5.1.7.3.4) aufgetrennt.

5.2.3.4 Western Blot

Um spezifische Proteine über die Detektion mit Antikörpern nachzuweisen, wurden durch SDS-PAGE (5.2.3.3) aufgetrennte Proteingemische auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid) Membran (BioRad, Richmond, USA) geblottet. Hierzu wurden die Polyacrylamid-Gele im Anschluss an die Auftrennung zusammen mit der (durch fünfminütige Inkubation in Methanol) hydrophilisierten PVDF Membran 10min in 1x Western-Blot Puffer äpuilibriert und anschließend die Proteine mittels elektrophoretischem Transfer (Whatman Biometra,

Fastblot B34 Unit, 1h bei 1,5mA pro cm² Membran) auf die Membran übertragen. Die PVDF Membranen wurden zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1 Stunde in Blockierungslösung (5.1.7.3.5) inkubiert und anschließend über Nacht bei 4°C mit dem Primär-Antikörper in geeigneter Verdünnung (1:100 bis 1:5000) geschwenkt. Nach dem Waschen (3x 5min mit dem entsprechenden Puffer ohne Zusatz) wurde die Membran mit einem, gegen den konstanten Teil des Primär-Antikörpers gerichteten (speziesspezifischen) Sekundär-Antikörper (1:4000) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden Alkalische Phosphatase konjugierte Sekundär-Antikörper verwendet. Nach dreimaligem Waschen (3x 10min mit dem entsprechenden Puffer) wurde das Substrat für die Alkalische Phosphatase (BCIP / NBT Substrate Kit, Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA) zugegeben. Durch Abspalten des Phosphatrestes vom 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat durch die Alkalische Phosphatase kommt es in Verbindung mit dem Nitroblau-Tetrazoliumchlorid zur Bildung eines violetten bis blauen Farbstoffes. Durch diese Farbreaktion konnten spezifische Proteinbanden auf den PVDF Membranen visualisiert werden.

5.2.4 Zellkulturmethoden

5.2.4.1 Kultivierung humaner Melanomzelllinien

Die verwendeten Melanomzelllinien (5.1.4) wurden in DMEM mit 10% (v/v) FKS und 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Zum Passagieren wurden die adhärennten Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit einer Trypsin/EDTA Lösung (0,05 bzw. 0,02% (w/v)) bei Raumtemperatur inkubiert, bis sie sich vom Boden der Zellkulturflasche gelöst hatten. Die flottierenden Zellen wurden in DMEM mit FKS aufgenommen und 4 Minuten bei 1.200 Upm (300 g) zentrifugiert, um das Trypsin von den Zellen zu entfernen. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellett in DMEM mit FKS resuspendiert und 1:5 bis 1:10 mit Medium verdünnt in neue Zellkulturflaschen verteilt. Das Zellkulturmedium wurde jeden zweiten Tag erneuert. Zur Kultur von Melanomzellen, welche stabil mit einem Expressionsvektor transfiziert worden waren (5.2.4.3), wurden dem Medium 25µl/ml Geneticin zugesetzt, um durch diesen Selektionsdruck die Ausverdünnung des Plasmids zu verhindern.

5.2.4.2 Kultivierung von normalen primären Melanozyten

Die verwendeten Melanozyten wurden zum Teil von der Firma PromoCell (Heidelberg) bezogen, zum Teil wurden sie innerhalb der Arbeitsgruppe selbst aus humanen Vorhäuten isoliert. Die Kultivierung erfolgte in Melanozytenmedium (Melanocyte Growth Medium 2, MGM2; PromoCell, Heidelberg). Das Kulturmedium wurde alle 2 bis 3 Tage gewechselt und die Zellen auf ihren melanozytären Phänotyp hin untersucht (hierbei wurde besonderes Augenmerk auf die Analyse der Expression von E-Cadherin, N-Cadherin und MIA gelegt). Verwendung fanden bevorzugt Zellen aus sehr frühen Passagen (1 bis 4), da die Zellen bei längerem Propagieren in Zellkultur ihre melanozytären Eigenschaften verlieren.

5.2.4.3 Transiente und stabile Transfektion humaner Zellen mit Plasmiden

Zur Transfektion von Melanomzellen mit Plasmiden wurde die Lipofektamin Methode mit Lipofektamin™ Reagent und LipofektaminPlus™ Reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA) verwendet. Für die transiente Transfektion wurden Zellen in 6-Well Platten ausgesät (300.000 Zellen pro Well). Bei 50-80% Konfluenz wurden die Zellen mit frischem Medium versorgt und der Transfektionsansatz nach Angaben des Herstellers zugegeben. Dabei wurden 0,5 bis 1,0 µg Plasmid DNA pro Versuchsansatz eingesetzt. Das Transfektionsgemisch wurde nach 4h durch frisches Medium ersetzt und die Zellen bis zur Ernte weitere 24 bis 48h inkubiert. Transient transfizierte Zellen wurden entweder in Luziferase-Reporter Assays (5.2.4.5) eingesetzt oder zur Isolation von Gesamtzellprotein (5.2.3.1) bzw. RNA (5.2.2.7) herangezogen.

Zur Herstellung stabil transfizierter Zelllinien wurde der entsprechende Expressionsvektor mittels der oben beschriebenen Methode in Zellen eingebracht und diese im Anschluss durch Zugabe eines Antibiotikums zum Kulturmedium einem Selektionsdruck ausgesetzt. Das Selektionsantibiotikum wurde anhand des vom eingebrachten Vektor codierten Resistenzgens ausgewählt.

Da sich normale humane Melanozyten mittels chemischer Methoden nur mit sehr geringer Effizienz transfizieren lassen, wurde für die Transfektion von Melanozyten auf die von der Firma Amaxa (Köln) entwickelte Nucleofector® Technologie, welche auf dem Prinzip der Elektroporation beruht, zurückgegriffen. Hierzu wurde der NHEM-Neo Nucleofector® Kit entsprechend des beiliegenden Protokolls verwendet.

5.2.4.4 Transfektion humaner Zellen mit kleinen RNA-Molekülen (siRNA, miRNA)

Die Transfektion humaner Melanomzelllinien mit kleinen RNA Molekülen (siRNAs und pre-miRTM bzw. anti-miRTM Moleküle) erfolgte unter Verwendung des HiPerFect Transfektionsreagens von Qiagen (Hilden). Hierfür wurden 200.000 Zellen pro Well einer 6-Well Kulturplatte in 2,3ml DMEM ohne FKS ausgesät. Anschließend wurden pro Well 5,4µl der entsprechenden siRNA, pre-miRTM oder anti-miRTM (20µM Stock-Lösung) mit 94,6µl DMEM ohne FKS vermischt und 18µl HiPerFect Transfektionsreagens zugegeben. Der Ansatz wurde gevortext, 10min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend unter Schwenken zu den flottierenden Zellen pipettiert. Nach vierstündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden dem Kulturmedium 10% (v/v) FKS zugesetzt. Sofern nicht anders angegeben wurden die Zellen nach 24h geerntet und in Abhängigkeit vom Ziel des jeweiligen Versuches weiterverarbeitet. Alternativ konnte zu diesem Zeitpunkt ein Wechsel des Mediums unter erneuter Zugabe von Transfektionskomplexen (Doppeltransfektion) durchgeführt werden.

Die Transfektion von normalen humanen Melanozyten mit kleinen RNA Molekülen erfolgte mittels der unter 5.2.4.3 beschriebenen Nucleofector[®] Technologie.

5.2.4.5 Luziferase Reportergen Assay

Regulatorische DNA-Sequenzen lassen sich mit Hilfe von Reportergen Analysen untersuchen. In der ursprünglichen Anwendung wird, um die Aktivität eines Promotors zu untersuchen, ein DNA Fragment, welches den Promotorbereich enthält, vor das Luziferase-Gen des Reporterplasmids pGL3-basic (siehe 5.1.5) kloniert. Die Expression des Reportergens verhält sich im eukaryontischen Testsystem proportional zum Aktivierungspotenzial des klonierten DNA-Fragments. Durch Zugabe eines Substrates (Luziferin) für das Enzym Luziferase kommt es in Anwesenheit von ATP, Mg²⁺ und O₂ zur Chemilumineszenz, welche in einem Luminometer gemessen wird. In dieser Arbeit wurde der Luziferase Assay in abgeänderter Form verwendet. Zwar wurden ebenfalls regulatorische DNA-Sequenzen untersucht, jedoch handelte es sich dabei nicht um Elemente im Promotor, sondern in der 3'UTR (3' untranslated region, 3' nicht-translatierter Bereich) des betreffenden Gens. Um die direkte Interaktion einer miRNA mit vorhergesagten target Sequenzen in der 3'UTR einer potenziellen Ziel-RNA nachzuweisen, wurde die vollständige 3'UTR der untersuchten mRNA hinter das Luziferase Reportergen eines pGL3-control Vektors (siehe 5.1.5) kloniert. Der pGL3-control Vektor besitzt SV40 (Simian vacuolating virus 40) Promotor und Enhancer Sequenzen, welche zu einer starken,

konstitutiven Expression des Luziferase Gens in den untersuchten humanen Zelllinien führen. Im Anschluss an die Klonierung entsteht ein Fusionstranskript bestehend aus der für die Luziferase codierenden Sequenz und der 3'UTR der untersuchten Ziel-RNA. Liegt in denjenigen Zellen, in welche dieses 3'UTR Reporterplasmid eingebracht wird ein hoher endogener Spiegel der regulierenden miRNA vor, bzw. werden künstliche, regulierende miRNAs in diese Zellen eingebracht, binden sie an die vorhandenen target Sequenzen und führen zu einer Stummschaltung der Luziferase Expression. Sind umgekehrt keine regulierenden miRNAs in den Zellen vorhanden, bzw. werden die entsprechenden endogenen miRNAs durch Transfektion von anti-miRs inhibiert, kommt es zur konstitutiven Expression des Luziferase Gens und somit zu einer starken messbaren Chemilumineszenz.

Um die unterschiedliche Transfektionseffizienz in einzelnen Versuchsansätze berücksichtigen zu können, wurden die Zellen mit einem zusätzlichen Vektor (pRL-TK, siehe 5.1.5), der das Luziferase Gen aus *Renilla reniformis* enthält, kotransfiziert. Die Chemilumineszenz der *Renilla* Luziferase wurde ebenfalls im Luminometer erfasst und für die Normalisierung der Werte in Anhängigkeit von der Transfektionseffizienz genutzt.

Zur Durchführung des Luziferase Assays wurde das Dual-Luciferase® Reporter Assay System der Firma Promega (Madison, USA) verwendet. Es wurden je 300.000 Zellen pro Well in 6-Well Platten ausgesät und nach der Lipofectamin bzw. der Nucleofector® Methode (siehe 5.2.4.3) transfiziert. Nach 24h wurde das Kulturmedium von den transfizierten Zellen abgegossen und die Zellkulturschale zweimal mit entionisiertem Wasser gespült. Anschließend wurden pro Well 300µl Lysispuffer (1:5 verdünnt; Promega, Madison, USA) zugegeben und die Zellen ca. 20 Minuten unter leichtem Schütteln lysiert. Nach erfolgter Lyse wurden je 50µl eines Versuchsansatzes unter Verwendung der im Kit bereitgestellten Chemikalien im Luminometer vermessen.

5.2.4.6 Migrations- und Matrigel Invasions-Assay (Boyden-Kammer)

Der Migrations- bzw. Matrigel Invasions-Assay diente zur Untersuchung von migratorischem und invasivem Potenzial verschiedener Zellklone. Hierzu wurden spezielle Kammern, genannt Boyden-Kammern, im unteren Kompartiment mit 210µl konditioniertem Medium befüllt. Zur Herstellung dieses Mediums wurden konfluente Fibroblasten 24 Stunden in Medium ohne FKS kultiviert, dieses Medium anschließend abgenommen, abzentrifugiert und für den Assay benutzt. Auf das konditionierte Medium im unteren Kompartiment wurde ein Polykarbonat Filter (Neuro Probe, Gaithersburg, USA) mit einer Porengröße von 8µm luftblasenfrei aufgelegt und der Aufsatz der Boydenkammer aufgeschraubt. Bei den Migrations Assays wurden die Filter im Vorfeld mit Gelatine beschichtet (siehe 5.2.1.2). Für

die Invasions Assays wurden zusätzlich 52µl Matrigel (1:3 verdünnt; BD Biosciences, Bedford, USA) luftblasenfrei auf den Filter aufgebracht. Das Gel wurde zum Gelieren für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Bei beiden Assays wurden die jeweiligen Zelllinien bzw. Zellklone mit PBS gewaschen, abtrypsiniert und gezählt, um eine Zellzahl von 30.000 Zellen pro ml (Migrations-Assay) bzw. von 200.000 Zellen pro ml (Invasions-Assay) einstellen zu können. Die Zellen wurden dabei in DMEM ohne FKS aufgenommen. Von der jeweiligen Zellsuspension wurden je 800µl pro Boydenkammer in das obere Kompartiment eingebracht und vier Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde die Zellsuspension aus allen Kammern abgegossen, der Aufsatz abgeschraubt und der Filter herausgenommen. Die Oberseite der Filter wurde an einem mit Wasser getränkten Papiertuch abgewischt, die Filter in einen Färberahmen eingelegt und mittels Hemacolor Schnellfärbung (bestehend aus Fixierlösung, Eosin-Färbelösung und Thiazin-Färbelösung; VWR, Darmstadt) gefärbt, mit Leitungswasser gespült und mit der Unterseite nach oben auf Objektträger aufgelegt. Anschließend wurde die Anzahl der gewanderten Zellen durch Auszählen im Mikroskop bestimmt.

5.2.5 Subkutane Injektion von Melanomzellen in athymische (*nu/nu*) Mäuse

Für die Injektion von Melanomzellen in immundefiziente Nacktmäuse wurde pro Versuchstier ein Falcon-Tube mit je 500.000 Zellen in 1ml PBS vorbereitet und an Dr. Thilo Spruß (Tierschutzbeauftragter der Universität Regensburg) weitergegeben, durch welchen die Versuchsdurchführung und Betreuung der Tiere erfolgte. Verwendet wurden Naval Medical Research Institute athymische (*nu/nu*) Mäuse aus der eigenen Zucht des Tierstalls der Universität Regensburg. Die subkutane Injektion der Zellen erfolgte in einem Volumen von 100µl in die Flanke der Tiere. Das Tumorwachstum wurde einmal wöchentlich kontrolliert, wobei auch (sofern vorhanden) das Tumolvolumen protokolliert wurde. Entstandene Tumoren wurden nach Tötung der Mäuse entnommen, halbiert und für die weiteren Analysen durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff kryokonserviert bzw. in Formalin eingelegt.

5.2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung der GraphPad Prism Software (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Sämtliche Experimente wurden (soweit nicht gesondert angegeben) in mindestens zwei unabhängigen Versuchen wiederholt. Ergebnisse werden als Mittelwert bzw. prozentualer Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt. Der

statistische Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit Hilfe des ungepaarten t-Tests ermittelt. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen. Hierbei gilt: *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ns: nicht signifikant.

Eigene Publikationen

Mueller DW, Bosserhoff AK.

Integrin beta(3) expression is regulated by let-7a miRNA in malignant melanoma.

Oncogene. 2008 Nov 6;27(52):6698-706. Epub 2008 Aug 4.

Mueller DW, Rehli M, Bosserhoff AK.

miRNA Expression Profiling in Melanocytes and Melanoma Cell Lines Reveals miRNAs Associated to Formation and Progression of Malignant Melanoma.

J Invest Dermatol. 2009 Feb 12. Epub ahead of print.

Mueller DW, Bosserhoff AK.

miRacles – new players in the regulation of known suspects.

Pigment Cell Melanoma Res. „News and Views“ Artikel. Zur Veröffentlichung akzeptiert.

Mueller DW, Bosserhoff AK.

Role of miRNAs in the progression of malignant melanoma.

Br J Cancer. Review Artikel. In Revision.

Braig S, Rothhammer T, **Mueller DW**, Bosserhoff AK.

microRNA miR-196a is a central regulator of HoxB7 and BMP4 expression in malignant melanoma.

Zur Veröffentlichung eingereicht.

Veröffentlichungen aus anderen Themengebieten:

Burghardt T, Saller M, Gürster S, **Mueller D**, Meyer C, Jahn U, Hochmuth E, Deutzmann R, Siedler F, Babinger P, Wirth R, Huber H, Rachel R.

Insight into the proteome of the hyperthermophilic Crenarchaeon *Ignicoccus hospitalis*: the major cytosolic and membrane proteins.

Arch Microbiol. 2008 Sep;190(3):379-94. Epub 2008 Jun 27.

Literaturverzeichnis

Abate-Shen C. Nat Rev Cancer. 2002 Oct;2(10):777-85.

Agrawal N, Kango M, Mishra A, Sinha P. Dev Biol. 1995 Nov;172(1):218-29.

Alami Y, Castronovo V, Belotti D, Flagiello D, Clausse N. Biochem Biophys Res Commun. 1999 Apr 21;257(3):738-45.

Albelda SM, Mette SA, Elder DE, Stewart R, Damjanovich L, Herlyn M, Buck CA. Cancer Res. 1990 Oct 15;50(20):6757-64.

Alemán LM, Doench J, Sharp PA. RNA. 2007 Mar;13(3):385-95. Epub 2007 Jan 19.

Algeciras-Schimnich A, Pietras EM, Barnhart BC, Legembre P, Vijayan S, Holbeck SL, Peter ME. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Sep 30;100(20):11445-50.

Altmeyer P, Bacharach-Buhles M. Enzyklopädie der Dermatologie, Venerologie, Allergologie, Umweltmedizin. (2007). Springer-Verlag, Heidelberg.

Ambros V, Horvitz HR. Science. 1984 Oct 26;226(4673):409-16.

Amiri KI, Richmond A. Cancer Metastasis Rev. 2005 Jun;24(2):301-13.

Apiou F, Flagiello D, Cillo C, Malfoy B, Poupon MF, Dutrillaux B. Cytogenet Cell Genet. 1996;73(1-2):114-5.

Arasu P, Wightman B, Ruvkun G. Genes Dev. 1991 Oct;5(10):1825-33.

Bagga S, Bracht J, Hunter S, Massirer K, Holtz J, Eachus R, Pasquinelli AE. 2005 Aug 26;122(4):553-63.

Bai XF, Ni XG, Zhao P, Liu SM, Wang HX, Guo B, Zhou LP, Liu F, Zhang JS, Wang K, Xie YQ, Shao YF, Zhao XH. World J Gastroenterol. 2004 May 15;10(10):1466-70.

Bar-Eli M. Pigment Cell Res. 2001 Apr;14(2):78-85.

Bartegi A, Roustan C, Kassab R, Fattoum A. Eur J Biochem. 1999 Jun;262(2):335-41.

Basu U, Si K, Warner JR, Maitra U. Mol Cell Biol. 2001 Mar;21(5):1453-62.

Bauer R, Humphries M, Fässler R, Winklmeier A, Craig SE, Bosserhoff AK. J Biol Chem. 2006 Apr 28;281(17):11669-77.

Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Doerks T, Stark A, Bork P, Izaurralde E. Genes Dev. 2006 Jul 15;20(14):1885-98.

Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Izaurralde E. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2006;71:523-30.

Bemis LT, Chen R, Amato CM, Classen EH, Robinson SE, Coffey DG, Erickson PF, Shellman YG, Robinson WA. Cancer Res. 2008 Mar 1;68(5):1362-8.

Berezikov E, Chung WJ, Willis J, Cuppen E, Lai EC. Mol Cell. 2007 Oct 26;28(2):328-36.

Bertz J, Giersiepen K, Haberland J, Hentschel S, Kaatsch P, Katalinic A, Stabenow R, Stegmaier C, Ziegler H. Krebs in Deutschland. 5.überarbeitete, aktualisierte Ausgabe.(2006). Saarbrücken, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI.

- Betel D, Wilson M, Gabow A, Marks DS, Sander C. *Nucleic Acids Res.* 2008 Jan;36 (Database issue):D149-53.
- Bijl JJ, Rieger E, van Oostveen JW, Walboomers JM, Kreike M, Willemze R, Meijer CJ. *Am J Pathol.* 1997 Oct;151(4):1067-74.
- Bilder D, Li M, Perrimon N. *Science.* 2000 Jul 7;289(5476):113-6.
- Birnboim HC, Doly J. *Nucleic Acids Res.* 1979 Nov 24;7(6):1513-23.
- Blesch A, Bosserhoff AK, Apfel R, Behl C, Hessdoerfer B, Schmitt A, Jachimczak P, Lottspeich F, Buettner R, Bogdahn U. *Cancer Res.* 1994 Nov 1;54(21):5695-701.
- Bogdan I, Xin H, Burg G, Böni R. *Melanoma Res.* 2001 Aug;11(4):349-54.
- Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. *Nat Struct Mol Biol.* 2006 Dec;13(12):1097-101.
- Borg JP. *Pathol Biol (Paris).* 2004 Jul;52(6):328-31.
- Bosserhoff AK. *Pigment Cell Res.* 2005 Dec;18(6):411-6.
- Bosserhoff AK, Moser M, Buettner R. *Gene Expr Patterns.* 2004 Jul;4(4):473-9.
- Bosserhoff AK, Stoll R, Sleeman JP, Bataille F, Buettner R, Holak TA. *Lab Invest.* 2003 Nov;83(11):1583-94.
- Bosserhoff AK, Moser M, Schölmerich J, Buettner R, Hellerbrand C. *J Biol Chem.* 2003 Apr 25;278(17):15225-31.
- Bosserhoff AK, Echtenacher B, Hein R, Buettner R. *Melanoma Res.* 2001 Aug;11(4):417-21.
- Bosserhoff AK, Kaufmann M, Kaluza B, Bartke I, Zirngibl H, Hein R, Stolz W, Buettner R. *Cancer Res.* 1997 Aug 1;57(15):3149-53.
- Boukerche H, Benchaibi M, Berthier-Vergnes O, Lizard G, Bailly M, Bailly M, McGregor JL. *Eur J Biochem.* 1994 Mar 1;220(2):485-91.
- Boyerinas B, Park SM, Shomron N, Hedegaard MM, Vinther J, Andersen JS, Feig C, Xu J, Burge CB, Peter ME. *Cancer Res.* 2008 Apr 15;68(8):2587-91.
- Brakebusch C, Fässler R. *EMBO J.* 2003 May 15;22(10):2324-33.
- Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. *PLoS Biol.* 2005 Mar;3(3):e85.
- Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM. *Cell.* 2003 Apr 4;113(1):25-36.
- Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G, Cheresch DA. *Cell.* 1994 Dec 30;79(7):1157-64.
- Brueckner B, Stresemann C, Kuner R, Mund C, Musch T, Meister M, Sülthmann H, Lyko F. *Cancer Res.* 2007 Feb 15;67(4):1419-23.
- Bushati N, Cohen SM. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007;23:175-205.
- Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. *N Engl J Med.* 2005 Oct 27;353(17):1793-801.

- Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, Shimizu M, Cimmino A, Zupo S, Dono M, Dell'Aquila ML, Alder H, Rassenti L, Kipps TJ, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Aug 10;101(32):11755-60.
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 2;101(9):2999-3004.
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Alder H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Nov 26;99(24):15524-9.
- Cannell IG, Kong YW, Bushell M. *Biochem Soc Trans*. 2008 Dec;36(Pt 6):1224-31.
- Caré A, Silvani A, Meccia E, Mattia G, Stoppacciaro A, Parmiani G, Peschle C, Colombo MP. *Mol Cell Biol*. 1996 Sep;16(9):4842-51.
- Chalfie M, Horvitz HR, Sulston JE. *Cell*. 1981 Apr;24(1):59-69.
- Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. *Cancer Res*. 2005 Jul 15;65(14):6029-33.
- Chang J, Nicolas E, Marks D, Sander C, Lerro A, Buendia MA, Xu C, Mason WS, Moloshok T, Bort R, Zaret KS, Taylor JM. *RNA Biol*. 2004 Jul;1(2):106-13.
- Chang PL, Cao M, Hicks P. *Carcinogenesis*. 2003 Nov;24(11):1749-58.
- Chang TC, Yu D, Lee YS, Wentzel EA, Arking DE, West KM, Dang CV, Thomas-Tikhonenko A, Mendell JT. *Nat Genet*. 2008 Jan;40(1):43-50. Epub 2007 Dec 9.
- Chekulaeva M, Hentze MW, Ephrussi A. *Cell*. 2006 Feb 10;124(3):521-33.
- Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. *Science*. 2004 Jan 2;303(5654):83-6.
- Chendrimada TP, Finn KJ, Ji X, Baillat D, Gregory RI, Liebhaber SA, Pasquinelli AE, Shiekhhattar R. *Nature*. 2007 Jun 14;447(7146):823-8.
- Chin L. *Nat Rev Cancer*. 2003 Aug;3(8):559-70.
- Cho PF, Poulin F, Cho-Park YA, Cho-Park IB, Chicoine JD, Lasko P, Sonenberg N. *Cell*. 2005 May 6;121(3):411-23.
- Chu CY, Rana TM. *PLoS Biol*. 2006 Jul;4(7):e210.
- Ciafrè SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu CG, Sabatino G, Negrini M, Maira G, Croce CM, Farace MG. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Sep 9;334(4):1351-8.
- Cillo C, Cantile M, Faiella A, Boncinelli E. *J Cell Physiol*. 2001 Aug;188(2):161-9.
- Cillo C, Cantile M, Mortarini R, Barba P, Parmiani G, Anichini A. *Int J Cancer*. 1996 May 29;66(5):692-7.
- Cillo C. *Invasion Metastasis*. 1994-1995;14(1-6):38-49.
- Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Sep 27;102(39):13944-9.
- Clark WH. *Br J Cancer*. 1991 Oct;64(4):631-44.
- Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D 4th, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M. *Hum Pathol*. 1984 Dec;15(12):1147-65.

Cohen-Salmon M, Frenz D, Liu W, Verpy E, Voegelings S, Petit C. J Biol Chem. 2000 Dec 22;275(51):40036-41.

Cree IA. J Pathol. 2000 Jun;191(2):112-4.

Danen EH, van Kraats AA, Cornelissen IM, Ruiter DJ, van Muijen GN. Biochem Biophys Res Commun. 1996 Sep 4;226(1):75-81.

Danen EH, Jansen KF, Van Kraats AA, Cornelissen IM, Ruiter DJ, Van Muijen GN. Int J Cancer. 1995 May 16;61(4):491-6.

Danen EH, Ten Berge PJ, Van Muijen GN, Van 't Hof-Grootenboer AE, Bröcker EB, Ruiter DJ. Histopathology. 1994 Mar;24(3):249-56.

Danninger C, Gimona M. J Cell Sci. 2000 Nov;113 Pt 21:3725-36.

Das R, Mahabeleshwar GH, Kundu GC. J Biol Chem. 2003 Aug 1;278(31):28593-606.

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Nature. 2002 Jun 27;417(6892):949-54.

De Martino I, Visone R, Fedele M, Petrocca F, Palmieri D, Martinez Hoyos J, Forzati F, Croce CM, Fusco A. Oncogene. 2009 Mar 19;28(11):1432-42.

De Martino I, Visone R, Palmieri D, Cappabianca P, Chieffi P, Forzati F, Barbieri A, Kruhoffer M, Lombardi G, Fusco A, Fedele M. Endocr Relat Cancer. 2007 Sep;14(3):875-86.

Debernardi S, Skoulakis S, Molloy G, Chaplin T, Dixon-McIver A, Young BD. Leukemia. 2007 May;21(5):912-6.

Dekker EJ, Pannese M, Houtzager E, Timmermans A, Boncinelli E, Durston A. Dev Suppl. 1992:195-202.

Derry MC, Yanagiya A, Martineau Y, Sonenberg N. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2006;71:537-43.

Dews M, Homayouni A, Yu D, Murphy D, Seignani C, Wentzel E, Furth EE, Lee WM, Enders GH, Mendell JT, Thomas-Tikhonenko A. Nat Genet. 2006 Sep;38(9):1060-5.

Doench JG, Sharp PA. Genes Dev. 2004 Mar 1;18(5):504-11.

Doench JG, Petersen CP, Sharp PA. Genes Dev. 2003 Feb 15;17(4):438-42.

Du T, Zamore PD. Development. 2005 Nov;132(21):4645-52.

Easow G, Teleman AA, Cohen SM. RNA. 2007 Aug;13(8):1198-204.

Enright AJ, John B, Gaul U, Tuschl T, Sander C, Marks DS. Genome Biol. 2003;5(1):R1. Epub 2003 Dec 12.

Eulalio A, Rehwinkel J, Stricker M, Huntzinger E, Yang SF, Doerks T, Dorner S, Bork P, Boutros M, Izaurralde E. Genes Dev. 2007 Oct 15;21(20):2558-70. Epub 2007 Sep 27.

Eulalio A, Behm-Ansmant I, Schweizer D, Izaurralde E. Mol Cell Biol. 2007 Jun;27(11):3970-81.

Felicetti F, Errico MC, Bottero L, Segnalini P, Stoppacciaro A, Biffoni M, Felli N, Mattia G, Petrini M, Colombo MP, Peschle C, Carè A. *Cancer Res.* 2008 Apr 15;68(8):2745-54.

Feltes CM, Kudo A, Blaschuk O, Byers SW. *Cancer Res.* 2002 Nov 15;62(22):6688-97.

Ferber S, Halkin A, Cohen H, Ber I, Einav Y, Goldberg I, Barshack I, Seijffers R, Kopolovic J, Kaiser N, Karasik A. *Nat Med.* 2000 May;6(5):568-72.

Filardo EJ, Brooks PC, Deming SL, Damsky C, Cheresch DA. *J Cell Biol.* 1995 Jul;130(2):441-50.

Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. *Nat Rev Genet.* 2008 Feb;9(2):102-14.

Filipowicz W, Jaskiewicz L, Kolb FA, Pillai RS. *Curr Opin Struct Biol.* 2005 Jun;15(3):331-41.

Gaidatzis D, van Nimwegen E, Hausser J, Zavolan M. *BMC Bioinformatics.* 2007 Mar 1;8:69.

Garbe C, Blum A. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 2001 Sep-Oct;14(5):280-90.

Garbe C, McLeod GR, Buettner PG. *Cancer.* 2000 Sep 15;89(6):1269-78.

Gaur A, Jewell DA, Liang Y, Ridzon D, Moore JH, Chen C, Ambros VR, Israel MA. *Cancer Res.* 2007 Mar 15;67(6):2456-68.

Geissinger E, Weisser C, Fischer P, Scharl M, Wellbrock C. *Cancer Res.* 2002 Aug 15;62(16):4820-8.

Gerke V, Moss SE. *Physiol Rev.* 2002 Apr;82(2):331-71.

Gille J, Swerlick RA. *Ann N Y Acad Sci.* 1996 Oct 25;797:93-106.

Gimona M, Kaverina I, Resch GP, Vignal E, Burgstaller G. *Mol Biol Cell.* 2003 Jun;14(6):2482-91.

Giraldez AJ, Mishima Y, Rihel J, Grocock RJ, Van Dongen S, Inoue K, Enright AJ, Schier AF. *Science.* 2006 Apr 7;312(5770):75-9.

Goldberg EK, Glendening JM, Karanjawala Z, Sridhar A, Walker GJ, Hayward NK, Rice AJ, Kurera D, Tebha Y, Fountain JW. *Am J Hum Genet.* 2000 Aug;67(2):417-31.

Graham A, Papalopulu N, Krumlauf R. *Cell.* 1989 May 5;57(3):367-78.

Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engle P, Lim LP, Bartel DP. *Mol Cell.* 2007 Jul 6;27(1):91-105.

Guba M, Bosserhoff AK, Steinbauer M, Abels C, Anthuber M, Buettner R, Jauch KW. *Br J Cancer.* 2000 Nov;83(9):1216-22.

Hayashi C, Rittling S, Hayata T, Amagasa T, Denhardt D, Ezura Y, Nakashima K, Noda M. *J Cell Biochem.* 2007 Jul 1;101(4):979-86.

Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, Yatabe Y, Kawahara K, Sekido Y, Takahashi T. *Cancer Res.* 2005 Nov 1;65(21):9628-32.

He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, Nagy R, Volinia S, Calin GA, Liu CG, Franssila K, Suster S, Kloos RT, Croce CM, de la Chapelle A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Dec 27;102(52):19075-80.

He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ, Hammond SM. *Nature.* 2005 Jun 9;435(7043):828-33.

Hebert C, Norris K, Scheper MA, Nikitakis N, Sauk JJ. *Mol Cancer.* 2007 Jan 14;6:5.

Hein R, Gummer M, Messer G, Plewig G. Klinische Typen des malignen Melanoms. [5. überarbeitete Ausgabe].(2000). München, Tumorzentrum München.

Hengge UR, Dummer R. Hrsg. Malignes Melanom. Standards und Innovationen in Diagnostik und Therapie. (2006). Köln, Deutscher Ärzte- Verlag GmbH.

Hieken TJ, Ronan SG, Farolan M, Shilkaitis AL, Das Gupta TK. 1999 Jan 15;85(2):375-82.

Hieken TJ, Farolan M, Ronan SG, Shilkaitis A, Wild L, Das Gupta TK. J Surg Res. 1996 Jun;63(1):169-73.

Hino K, Tsuchiya K, Fukao T, Kiga K, Okamoto R, Kanai T, Watanabe M. RNA. 2008 Jul;14(7):1433-42.

Hoffmann I, Balling R. Dev Biol. 1995 May;169(1):337-46.

Horiuchi A, Nikaido T, Ito K, Zhai Y, Orii A, Taniguchi S, Toki T, Fujii S. Lab Invest. 1998 Jul;78(7):839-46.

Hsu M, Andl T, Li G, Meinkoth JL, Herlyn M. J Cell Sci. 2000 May;113 (Pt 9):1535-42.

Hsu MY, Meier F, Herlyn M. Differentiation. 2002 Dec;70(9-10):522-36.

Hsu MY, Meier FE, Nesbit M, Hsu JY, Van Belle P, Elder DE, Herlyn M. Am J Pathol. 2000 May;156(5):1515-25.

Hsu MY, Shih DT, Meier FE, Van Belle P, Hsu JY, Elder DE, Buck CA, Herlyn M. Am J Pathol. 1998 Nov;153(5):1435-42.

Hsu MY, Wheelock MJ, Johnson KR, Herlyn M. J Investig Dermatol Symp Proc. 1996 Apr;1(2):188-94.

Hu N, Flaig MJ, Su H, Shou JZ, Roth MJ, Li WJ, Wang C, Goldstein AM, Li G, Emmert-Buck MR, Taylor PR. Clin Cancer Res. 2004 Sep 15;10(18 Pt 1):6013-22.

Huang Q, Gumireddy K, Schrier M, le Sage C, Nagel R, Nair S, Egan DA, Li A, Huang G, Klein-Szanto AJ, Gimotty PA, Katsaros D, Coukos G, Zhang L, Puré E, Agami R. Nat Cell Biol. 2008 Feb;10(2):202-10.

Huang S, Jean D, Luca M, Tainsky MA, Bar-Eli M. EMBO J. 1998 Aug 3;17(15):4358-69.

Hueber SD, Lohmann I. Bioessays. 2008 Oct;30(10):965-79.

Hullinger TG, Pan Q, Viswanathan HL, Somerman MJ. Exp Cell Res. 2001 Jan 1;262(1):69-74.

Humphreys DT, Westman BJ, Martin DI, Preiss T. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Nov 22;102(47):16961-6.

Humphries MJ. Biochem Soc Trans. 2000;28(4):311-39.

Humphries MJ. Curr Opin Cell Biol. 1996 Oct;8(5):632-40.

Hutterer A, Betschinger J, Petronczki M, Knoblich JA. Dev Cell. 2004 Jun;6(6):845-54.

Hutvágner G, Zamore PD. Science. 2002 Sep 20;297(5589):2056-60.

Hwang HW, Mendell JT. Br J Cancer. 2006 Mar 27;94(6):776-80.

Ilgoucheva O, Alexeev V. Biochem Biophys Res Commun. 2009 Feb 13;379(3):790-4.

Iida S, Rao PH, Nallasivam P, Hibshoosh H, Butler M, Louie DC, Dyomin V, Ohno H, Chaganti RS, Dalla-Favera R. *Blood*. 1996 Dec 1;88(11):4110-7.

Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Ménard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM. *Cancer Res*. 2005 Aug 15;65(16):7065-70.

Ish-Horowicz D, Burke JF. *Nucleic Acids Res*. 1981 Jul 10;9(13):2989-98.

Jacob K, Wach F, Holzapfel U, Hein R, Lengyel E, Buettner R, Bosserhoff AK. *Melanoma Res*. 1998 Jun;8(3):211-9.

Jacob K, Bosserhoff AK, Wach F, Knüchel R, Klein EC, Hein R, Buettner R. *Int J Cancer*. 1995 Mar 3;60(5):668-75.

Jakymiw A, Lian S, Eystathioy T, Li S, Satoh M, Hamel JC, Fritzler MJ, Chan EK. *Nat Cell Biol*. 2005 Dec;7(12):1267-74.

Jean D, Gershenwald JE, Huang S, Luca M, Hudson MJ, Tainsky MA, Bar-Eli M. *J Biol Chem*. 1998 Jun 26;273(26):16501-8.

Jin Y, Wilhide CC, Dang C, Li L, Li SX, Villa-Garcia M, Bray PF. *Blood*. 1998 Oct 15;92(8):2777-90.

John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. *PLoS Biol*. 2004 Nov;2(11):e363.

Johnson CD, Esquela-Kerscher A, Stefani G, Byrom M, Kelnar K, Ovcharenko D, Wilson M, Wang X, Shelton J, Shingara J, Chin L, Brown D, Slack FJ. *Cancer Res*. 2007 Aug 15;67(16):7713-22.

Johnson JP. *Cancer Metastasis Rev*. 1999;18(3):345-57.

Johnson MD, Kamso-Pratt J, Pepinsky RB, Whetsell WO Jr. *Hum Pathol*. 1989 Aug;20(8):772-6.

Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. *Cell*. 2005 Mar 11;120(5):635-47.

Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B. *Annu Rev Plant Biol*. 2006;57:19-53.

Jäger D, Stockert E, Jäger E, Güre AO, Scanlan MJ, Knuth A, Old LJ, Chen YT. *Cancer Res*. 2000 Jul 1;60(13):3584-91.

Kang JS, Calvo BF, Maygarden SJ, Caskey LS, Mohler JL, Ornstein DK. *Clin Cancer Res*. 2002 Jan;8(1):117-23.

Kapp LD, Lorsch JR. *Annu Rev Biochem*. 2004;73:657-704.

Kaur S, Singh G, Stock JL, Schreiner CM, Kier AB, Yager KL, Mucenski ML, Scott WJ Jr, Potter SS. *J Exp Zool*. 1992 Dec 1;264(3):323-36.

Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, Gaul U, Segal E. *Nat Genet*. 2007 Oct;39(10):1278-84.

Kiriakidou M, Tan GS, Lamprinaki S, De Planell-Saguer M, Nelson PT, Mourelatos Z. *Cell*. 2007 Jun 15;129(6):1141-51.

Kiriakidou M, Nelson PT, Kouranov A, Fitziev P, Bouyioukos C, Mourelatos Z, Hatzigeorgiou A. *Genes Dev*. 2004 May 15;18(10):1165-78.

Kloosterman WP, Wienholds E, Ketting RF, Plasterk RH. *Nucleic Acids Res*. 2004 Dec 7;32(21):6284-91.

- Kong YW, Cannell IG, de Moor CH, Hill K, Garside PG, Hamilton TL, Meijer HA, Dobbryn HC, Stoneley M, Spriggs KA, Willis AE, Bushell M. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jul 1;105(26):8866-71.
- Kraehn GM, Utikal J, Udart M, Greulich KM, Bezold G, Kaskel P, Leiter U, Peter RU. *Br J Cancer*. 2001 Jan 5;84(1):72-9.
- Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M, Rajewsky N. *Nat Genet*. 2005 May;37(5):495-500.
- Kuijpers KA, Heesakkers JP, Jansen CF, Schalken JA. *Eur Urol*. 2007 Oct;52(4):1213-21.
- Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. *Nat Genet*. 2007 May;39(5):673-7.
- Kuphal S, Bosserhoff AK. *Oncogene*. 2006 Jan 12;25(2):248-59.
- Kuphal S, Wallner S, Schimanski CC, Bataille F, Hofer P, Strand S, Strand D, Bosserhoff AK. *Oncogene*. 2006 Jan 5;25(1):103-10.
- Kuphal S, Palm HG, Poser I, Bosserhoff AK. *Melanoma Res*. 2005 Aug;15(4):305-13.
- Kuphal S, Poser I, Jobin C, Hellerbrand C, Bosserhoff AK. *Oncogene*. 2004 Nov 4;23(52):8509-19.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, Borkhardt A, Tuschl T. *RNA*. 2003 Feb;9(2):175-9.
- Leali D, Dell'Era P, Stabile H, Sennino B, Chambers AF, Naldini A, Sozzani S, Nico B, Ribatti D, Presta M. *J Immunol*. 2003 Jul 15;171(2):1085-93.
- Lee DM, Kiener HP, Agarwal SK, Noss EH, Watts GF, Chisaka O, Takeichi M, Brenner MB. *Science*. 2007 Feb 16;315(5814):1006-10.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):843-54.
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. *EMBO J*. 2004 Oct 13;23(20):4051-60.
- Lee YS, Dutta A. *Genes Dev*. 2007 May 1;21(9):1025-30.
- Lee YS, Kim HK, Chung S, Kim KS, Dutta A. *J Biol Chem*. 2005 Apr 29;280(17):16635-41.
- Lei H, Juan AH, Kim MS, Ruddle FH. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jul 5;103(27):10305-9.
- Lei H, Wang H, Juan AH, Ruddle FH. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Feb 15;102(7):2420-4.
- Lener T, Burgstaller G, Gimona M. *FEBS Lett*. 2004 Jan 2;556(1-3):221-6.
- Levy C, Khaled M, Fisher DE. *Trends Mol Med*. 2006 Sep;12(9):406-14.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. *Cell*. 2005 Jan 14;120(1):15-20.
- Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. *Cell*. 2003 Dec 26;115(7):787-98.
- Li G, Herlyn M. *Mol Med Today*. 2000 Apr;6(4):163-9.
- Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. *Nature*. 2005 Feb 17;433(7027):769-73.
- Lim LP, Glasner ME, Yekta S, Burge CB, Bartel DP. *Science*. 2003 Mar 7;299(5612):1540.
- Liu J, Rivas FV, Wohlschlegel J, Yates JR 3rd, Parker R, Hannon GJ. *Nat Cell Biol*. 2005 Dec;7(12):1261-6.

Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. *Nature*. 2005 Jun 9;435(7043):834-8.

Luthra R, Singh RR, Luthra MG, Li YX, Hannah C, Romans AM, Barkoh BA, Chen SS, Ensor J, Maru DM, Broaddus RR, Rashid A, Albarracin CT. *Oncogene*. 2008 Nov 6;27(52):6667-78.

Lytle JR, Yario TA, Steitz JA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jun 5;104(23):9667-72.

Maeda K, Hamada J, Takahashi Y, Tada M, Yamamoto Y, Sugihara T, Moriuchi T. *Int J Cancer*. 2005 Apr 10;114(3):436-41.

Magli MC, Barba P, Celetti A, De Vita G, Cillo C, Boncinelli E. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Jul 15;88(14):6348-52.

Marcotrigiano J, Gingras AC, Sonenberg N, Burley SK. *Cell*. 1997 Jun 13;89(6):951-61.

Maroney PA, Yu Y, Fisher J, Nilsen TW. *Nat Struct Mol Biol*. 2006 Dec;13(12):1102-7.

Masaki T, Tokuda M, Ohnishi M, Watanabe S, Fujimura T, Miyamoto K, Itano T, Matsui H, Arima K, Shirai M, Maeba T, Sogawa K, Konishi R, Taniguchi K, Hatanaka Y, Hatase O, Nishioka M. *Hepatology*. 1996 Jul;24(1):72-81.

Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin YV, Parsyan A, Huck L, Murata T, Biffo S, Merrick WC, Darzynkiewicz E, Pillai RS, Filipowicz W, Duchaine TF, Sonenberg N. *Science*. 2007 Sep 21;317(5845):1764-7.

Matsubara H, Takeuchi T, Nishikawa E, Yanagisawa K, Hayashita Y, Ebi H, Yamada H, Suzuki M, Nagino M, Nimura Y, Osada H, Takahashi T. *Oncogene*. 2007 Sep 6;26(41):6099-105.

Maulbecker CC, Gruss P. *Cell Growth Differ*. 1993 May;4(5):431-41. Mayr C, Hemann MT, Bartel DP. *Science*. 2007 Mar 16;315(5818):1576-9.

McGill GG, Horstmann M, Widlund HR, Du J, Motyckova G, Nishimura EK, Lin YL, Ramaswamy S, Avery W, Ding HF, Jordan SA, Jackson IJ, Korsmeyer SJ, Golub TR, Fisher DE. *Cell*. 2002 Jun 14;109(6):707-18.

Meehan KL, Holland JW, Dawkins HJ. 2002 Jan 1;50(1):54-63.

Megraw M, Sethupathy P, Corda B, Hatzigeorgiou AG. *Nucleic Acids Res*. 2007 Jan;35(Database issue):D149-55.

Meier F, Satyamoorthy K, Nesbit M, Hsu MY, Schitteck B, Garbe C, Herlyn M. *Front Biosci*. 1998 Sep 15;3:D1005-10.

Meister G, Landthaler M, Peters L, Chen PY, Urlaub H, Lührmann R, Tuschl T. *Curr Biol*. 2005 Dec 6;15(23):2149-55.

Melillo RM, Pierantoni GM, Scala S, Battista S, Fedele M, Stella A, De Biasio MC, Chiappetta G, Fidanza V, Condorelli G, Santoro M, Croce CM, Viglietto G, Fusco A. *Mol Cell Biol*. 2001 Apr;21(7):2485-95.

Merrick WC. *Gene*. 2004 May 12;332:1-11.

Meyskens FL Jr, Farmer PJ, Anton-Culver H. *Clin Cancer Res*. 2004 Apr 15;10(8):2581-3.

Mi Z, Guo H, Wai PY, Gao C, Kuo PC. *Carcinogenesis*. 2006 Jun;27(6):1134-45.

Miller AJ, Mihm MC Jr. *Melanoma*. *N Engl J Med*. 2006 Jul 6;355(1):51-65.

Miller GJ, Miller HL, van Bokhoven A, Lambert JR, Werahera PN, Schirripa O, Lucia MS, Nordeen SK. *Cancer Res.* 2003 Sep 15;63(18):5879-88.

Mirnezami AH, Pickard K, Zhang L, Primrose JN, Packham G. *Eur J Surg Oncol.* 2009 Apr;35(4):339-47.

Mishima Y, Giraldez AJ, Takeda Y, Fujiwara T, Sakamoto H, Schier AF, Inoue K. *Curr Biol.* 2006 Nov 7;16(21):2135-42.

Montgomery AM, Becker JC, Siu CH, Lemmon VP, Cheresch DA, Pancook JD, Zhao X, Reisfeld RA. *J Cell Biol.* 1996 Feb;132(3):475-85.

Montgomery AM, Reisfeld RA, Cheresch DA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Sep 13;91(19):8856-60.

Mortlock DP, Innis JW. *Nat Genet.* 1997 Feb;15(2):179-80.

Mueller DW, Rehli M, Bosserhoff AK. *J Invest Dermatol.* 2009 Feb 12. [Epub ahead of print]

Murakami M, Suzuki M, Nishino Y, Funaba M. *Mol Biol Rep.* 2009 Mar 14. [Epub ahead of print]

Müller DW, Bosserhoff AK. *Oncogene.* 2008 Nov 6;27(52):6698-706.

Nakabeppu Y, Ryder K, Nathans D. *Cell.* 1988 Dec 2;55(5):907-15.

Nakamura T, Largaespada DA, Shaughnessy JD Jr, Jenkins NA, Copeland NG. *Nat Genet.* 1996 Feb;12(2):149-53.

Natali PG, Hamby CV, Felding-Habermann B, Liang B, Nicotra MR, Di Filippo F, Giannarelli D, Temponi M, Ferrone S. *Cancer Res.* 1997 Apr 15;57(8):1554-60.

Natali PG, Nicotra MR, Di Filippo F, Bigotti A. *Br J Cancer.* 1995 Jun;71(6):1243-7.

Nemoto H, Rittling SR, Yoshitake H, Furuya K, Amagasa T, Tsuji K, Nifuji A, Denhardt DT, Noda M. *J Bone Miner Res.* 2001 Apr;16(4):652-9.

Nielsen CB, Shomron N, Sandberg R, Hornstein E, Kitzman J, Burge CB. *RNA.* 2007 Nov;13(11):1894-910.

Nieto MA. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 Mar;3(3):155-66.

Nip J, Rabbani SA, Shibata HR, Brodt P. *J Clin Invest.* 1995 May;95(5):2096-103.

Nollet F, Kools P, van Roy F. *J Mol Biol.* 2000 Jun 9;299(3):551-72.

Nottrott S, Simard MJ, Richter JD. *Nat Struct Mol Biol.* 2006 Dec;13(12):1108-14.

O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. *Nature.* 2005 Jun 9;435(7043):839-43.

Oikawa T. *Cancer Sci.* 2004 Aug;95(8):626-33.

Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai EC. *Cell.* 2007 Jul 13;130(1):89-100.

Okazaki M, Takeshita S, Kawai S, Kikuno R, Tsujimura A, Kudo A, Amann E. *J Biol Chem.* 1994 Apr 22;269(16):12092-8.

Olsen PH, Ambros V. *Dev Biol.* 1999 Dec 15;216(2):671-80.

Orfanos CE, Jung EG, Rassner G, Wolff HH, Garbe C. *Hautarzt.* 1994 May;45(5):285-91.

Ota A, Tagawa H, Karnan S, Tsuzuki S, Karpas A, Kira S, Yoshida Y, Seto M. *Cancer Res.* 2004 May 1;64(9):3087-95.

Panizzon RG, Guggisberg D. *Ther Umsch.* 1999; 56(6):302-308.

Park SM, Shell S, Radjabli AR, Schickel R, Feig C, Boyerinas B, Dinulescu DM, Lengyel E, Peter ME. *Cell Cycle.* 2007 Nov 1;6(21):2585-90.

Parker R, Sheth U. *Mol Cell.* 2007 Mar 9;25(5):635-46.

Parker R, Song H. *Nat Struct Mol Biol.* 2004 Feb;11(2):121-7.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. *Int J Cancer.* 2001 Oct 15;94(2):153-6.

Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B, Müller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G. *Nature.* 2000 Nov 2;408(6808):86-9.

Pattyn A, Goridis C, Brunet JF. *Mol Cell Neurosci.* 2000 Mar;15(3):235-43.

Peinado H, Portillo F, Cano A. *Int J Dev Biol.* 2004;48(5-6):365-75.

Perlis C, Herlyn M. *Oncologist.* 2004;9(2):182-7.

Peter ME. *Cell Cycle.* 2009 Mar 15;8(6):843-52.

Peters L, Meister G. *Mol Cell.* 2007 Jun 8;26(5):611-23.

Petrocca F, Visone R, Onelli MR, Shah MH, Nicoloso MS, de Martino I, Iliopoulos D, Pilozi E, Liu CG, Negrini M, Cavazzini L, Volinia S, Alder H, Ruco LP, Baldassarre G, Croce CM, Vecchione A. *Cancer Cell.* 2008 Mar;13(3):272-86.

Philip S, Bulbule A, Kundu GC. *J Biol Chem.* 2001 Nov 30;276(48):44926-35.

Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E, Bertrand E, Filipowicz W. *Science.* 2005 Sep 2;309(5740):1573-6.

Plant PJ, Fawcett JP, Lin DC, Holdorf AD, Binns K, Kulkarni S, Pawson T. *Nat Cell Biol.* 2003 Apr;5(4):301-8.

Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yut LM, Stark M, Robbins CM, Moses TY, Hostetter G, Wagner U, Kakareka J, Salem G, Pohida T, Heenan P, Duray P, Kallioniemi O, Hayward NK, Trent JM, Meltzer PS. *Nat Genet.* 2003 Jan;33(1):19-20.

Porkka KP, Pfeiffer MJ, Waltering KK, Vessella RL, Tammela TL, Visakorpi T. *Cancer Res.* 2007 Jul 1;67(13):6130-5.

Poser I, Tatzel J, Kuphal S, Bosserhoff AK. *Oncogene.* 2004 Aug 12;23(36):6115-24.

Poser I, Domínguez D, de Herreros AG, Varnai A, Buettner R, Bosserhoff AK. *J Biol Chem.* 2001 Jul 6;276(27):24661-6.

Quade BJ, Weremowicz S, Neskey DM, Vanni R, Ladd C, Dal Cin P, Morton CC. *Cancer Res.* 2003 Mar 15;63(6):1351-8.

Rana TM. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Jan;8(1):23-36.

Reeves R. *Gene.* 2001 Oct 17;277(1-2):63-81.

- Reeves R, Nissen MS. J Biol Chem. 1990 May 25;265(15):8573-82.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. Nature. 2000 Feb 24;403(6772):901-6.
- Rendtorff ND, Frödin M, Attié-Bitach T, Vekemans M, Tommerup N. Genomics. 2001 Jan 1;71(1):40-52.
- Reynolds AB, Daniel J, McCrea PD, Wheelock MJ, Wu J, Zhang Z. Mol Cell Biol. 1994 Dec;14(12):8333-42.
- Richter JD, Sonenberg N. Nature. 2005 Feb 3;433(7025):477-80.
- Rittling SR, Chambers AF. Br J Cancer. 2004 May 17;90(10):1877-81.
- Robertson NG, Heller S, Lin JS, Resendes BL, Weremowicz S, Denis CS, Bell AM, Hudspeth AJ, Morton CC. Genomics. 2000 Jun 15;66(3):242-8.
- Rondepierre F, Bouchon B, Papon J, Bonnet-Duquennoy M, Kintossou R, Moins N, Maublant J, Madelmont JC, D'Incan M, Degoul F. Biochim Biophys Acta. 2009 Jan;1794(1):61-9.
- Rothhammer T, Poser I, Soncin F, Bataille F, Moser M, Bosserhoff AK. Cancer Res. 2005 Jan 15;65(2):448-56.
- Rothhammer T, Hahne JC, Florin A, Poser I, Soncin F, Wernert N, Bosserhoff AK. Cell Mol Life Sci. 2004 Jan;61(1):118-28.
- Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Nature. 2007 Jul 5;448(7149):83-6.
- Russell DW, Spremulli LL. J Biol Chem. 1978 Oct 10;253(19):6647-9.
- Ruvkun G, Giusto J. Nature. 1989 Mar 23;338(6213):313-9.
- Rüegg C, Yilmaz A, Bieler G, Bamat J, Chaubert P, Lejeune FJ. Nat Med. 1998 Apr;4(4):408-14.
- S**ampson VB, Rong NH, Han J, Yang Q, Aris V, Soteropoulos P, Petrelli NJ, Dunn SP, Krueger LJ. Cancer Res. 2007 Oct 15;67(20):9762-70.
- Sander CA, Flaig MJ, Starz H, Gummer M, Haraida S. Histopathologie des malignen Melanoms. [MANUALMaligne Melanome], 28-31.(2000). München, Tumorzentrum München.
- Sanders DS, Blessing K, Hassan GA, Bruton R, Marsden JR, Jankowski J. Mol Pathol. 1999 Jun;52(3):151-7.
- Sanvito F, Piatti S, Villa A, Bossi M, Lucchini G, Marchisio PC, Biffo S. J Cell Biol. 1999 Mar 8;144(5):823-37.
- Satyamoorthy K, Herlyn M. Cancer Biol Ther. 2002 Jan-Feb;1(1):14-7.
- Scatena M, Almeida M, Chaisson ML, Fausto N, Nicosia RF, Giachelli CM. J Cell Biol. 1998 May 18;141(4):1083-93.
- Schlagbauer-Wadl H, Griffioen M, van Elsas A, Schrier PI, Pustelnik T, Eichler HG, Wolff K, Pehamberger H, Jansen B. J Invest Dermatol. 1999 Mar;112(3):332-6.
- Schmitter D, Filkowski J, Sewer A, Pillai RS, Oakeley EJ, Zavolan M, Svoboda P, Filipowicz W. Nucleic Acids Res. 2006;34(17):4801-15.
- Schneller M, Vuori K, Ruoslahti E. EMBO J. 1997 Sep 15;16(18):5600-7.

- Schuieler MM, Bataille F, Hagan S, Kolch W, Bosserhoff AK. *Cancer Res.* 2004 Aug 1;64(15):5186-92.
- Seftor RE, Seftor EA, Hendrix MJ. *Cancer Metastasis Rev.* 1999;18(3):359-75.
- Seftor RE, Seftor EA, Gehlsen KR, Stetler-Stevenson WG, Brown PD, Ruoslahti E, Hendrix MJ. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Mar 1;89(5):1557-61.
- Seggerson K, Tang L, Moss EG. *Dev Biol.* 2002 Mar 15;243(2):215-25.
- Segura MF, Hanniford D, Menendez S, Reavie L, Zou X, Alvarez-Diaz S, Zakrzewski J, Blochin E, Rose A, Bogunovic D, Polsky D, Wei J, Lee P, Belitskaya-Levy I, Bhardwaj N, Osman I, Hernando E. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Feb 10;106(6):1814-9.
- Shell S, Park SM, Radjabi AR, Schickel R, Kistner EO, Jewell DA, Feig C, Lengyel E, Peter ME. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jul 3;104(27):11400-5.
- Shen D, Nooraie F, Elshimali Y, Lonsberry V, He J, Bose S, Chia D, Seligson D, Chang HR, Goodglick L. *Hum Pathol.* 2006 Dec;37(12):1583-91.
- Shi L, Cheng Z, Zhang J, Li R, Zhao P, Fu Z, You Y. *Brain Res.* 2008 Oct 21;1236:185-93.
- Shibamoto S, Hayakawa M, Takeuchi K, Hori T, Miyazawa K, Kitamura N, Johnson KR, Wheelock MJ, Matsuyoshi N, Takeichi M, et al. *J Cell Biol.* 1995 Mar;128(5):949-57.
- Si K, Maitra U. *Mol Cell Biol.* 1999 Feb;19(2):1416-26.
- Silye R, Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Poole S, van Noorden S, Batchelor W, Regele H, Sega W, Boesmueller H, Krausz T, Pignatelli M. *J Pathol.* 1998 Dec;186(4):350-5.
- Sinha P, Hütter G, Köttgen E, Dietel M, Schadendorf D, Lage H. *J Biochem Biophys Methods.* 1998 Nov 18;37(3):105-16.
- Slack FJ, Basson M, Liu Z, Ambros V, Horvitz HR, Ruvkun G. *Mol Cell.* 2000 Apr;5(4):659-69.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. *Anal Biochem.* 1985 Oct;150(1):76-85.
- Solito E, de Coupade C, Canaider S, Goulding NJ, Perretti M. *Br J Pharmacol.* 2001 May;133(2):217-28.
- Sonoki T, Iwanaga E, Mitsuya H, Asou N. *Leukemia.* 2005 Nov;19(11):2009-10.
- Sontheimer EJ. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 Feb;6(2):127-38.
- Srebrow A, Friedmann Y, Ravanpay A, Daniel CW, Bissell MJ. *J Cell Biochem.* 1998 Jun 15;69(4):377-91.
- Staddon JM, Smales C, Schulze C, Esch FS, Rubin LL. *J Cell Biol.* 1995 Jul;130(2):369-81.
- Stark A, Brennecke J, Russell RB, Cohen SM. *PLoS Biol.* 2003 Dec;1(3):E60.
- Steingrímsson E, Copeland NG, Jenkins NA. Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. *Annu Rev Genet.* 2004;38:365-411.
- Stoll R, Renner C, Zweckstetter M, Brüggert M, Ambrosius D, Palme S, Engh RA, Golob M, Breibach I, Buettner R, Voelter W, Holak TA, Bosserhoff AK. *EMBO J.* 2001 Feb 1;20(3):340-9.
- Strand D, Unger S, Corvi R, Hartenstein K, Schenkel H, Kalmes A, Merdes G, Neumann B, Krieg-Schneider F, Coy JF, et al. *Oncogene.* 1995 Jul 20;11(2):291-301.

Strand D, Jakobs R, Merdes G, Neumann B, Kalmes A, Heid HW, Husmann I, Mechler BM. *J Cell Biol.* 1994 Dec;127(5):1361-73.

Strand D, Raska I, Mechler BM. *J Cell Biol.* 1994 Dec;127(5):1345-60.

Stuart ET, Yokota Y, Gruss P. *Adv Genet.* 1995;33:255-74.

Takada Y, Kamata T, Irie A, Puzon-McLaughlin W, Zhang XP. *Matrix Biol.* 1997 Oct;16(4):143-51.

Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T. *Cancer Res.* 2004 Jun 1;64(11):3753-6.

Takeichi M. *Curr Opin Cell Biol.* 1995 Oct;7(5):619-27.

Takeoka M, Ehara T, Sagara J, Hashimoto S, Taniguchi S. *Eur J Cancer.* 2002 Feb;38(3):436-42.

Tanentzapf G, Tepass U. *Nat Cell Biol.* 2003 Jan;5(1):46-52.

Tatzel J, Poser I, Schroeder J, Bosserhoff AK. *Pigment Cell Res.* 2005 Apr;18(2):92-101.

Thanos D, Maniatis T. *Cell.* 1995 Dec 29;83(7):1091-100.

Thermann R, Hentze MW. *Nature.* 2007 Jun 14;447(7146):875-8.

Thiery JP. *Nat Rev Cancer.* 2002 Jun;2(6):442-54.

Thorsteinsdottir U, Mamo A, Kroon E, Jerome L, Bijl J, Lawrence HJ, Humphries K, Sauvageau G. *Blood.* 2002 Jan 1;99(1):121-9.

Thorsteinsdottir U, Sauvageau G, Humphries RK. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1997 Dec;11(6):1221-37.

Thuault S, Valcourt U, Petersen M, Manfioletti G, Heldin CH, Moustakas A. *J Cell Biol.* 2006 Jul 17;174(2):175-83.

Till S, Lejeune E, Thermann R, Bortfeld M, Hothorn M, Enderle D, Heinrich C, Hentze MW, Ladurner AG. *Nat Struct Mol Biol.* 2007 Oct;14(10):897-903.

Tolia NH, Joshua-Tor L. *Nat Chem Biol.* 2007 Jan;3(1):36-43.

Tomari Y, Matranga C, Haley B, Martinez N, Zamore PD. *Science.* 2004 Nov 19;306(5700):1377-80.

Tomotsune D, Shoji H, Wakamatsu Y, Kondoh H, Takahashi N. *Nature.* 1993 Sep 2;365(6441):69-72.

Tuck AB, Elliott BE, Hota C, Tremblay E, Chambers AF. *J Cell Biochem.* 2000 Jun 6;78(3):465-75.

Tuck AB, Arsenault DM, O'Malley FP, Hota C, Ling MC, Wilson SM, Chambers AF. *Oncogene.* 1999 Jul 22;18(29):4237-46.

Tuck AB, O'Malley FP, Singhal H, Harris JF, Tonkin KS, Kerkvliet N, Saad Z, Doig GS, Chambers AF. *Int J Cancer.* 1998 Oct 23;79(5):502-8.

Tuck AB, O'Malley FP, Singhal H, Tonkin KS, Harris JF, Bautista D, Chambers AF. *Arch Pathol Lab Med.* 1997 Jun;121(6):578-84.

Ue T, Yokozaki H, Kitadai Y, Yamamoto S, Yasui W, Ishikawa T, Tahara E. *Int J Cancer.* 1998 Apr 17;79(2):127-32.

Urabe A, Nakayama J, Taniguchi S, Terao H, Hori Y. *J Pathol.* 1992 Nov;168(3):281-6.

- Van Belle PA, Elenitsas R, Satyamoorthy K, Wolfe JT, Guerry D 4th, Schuchter L, Van Belle TJ, Albelda S, Tahin P, Herlyn M, Elder DE. *Hum Pathol.* 1999 May;30(5):562-7.
- van der Flier A, Sonnenberg A. *Cell Tissue Res.* 2001 Sep;305(3):285-98.
- Vella MC, Reinert K, Slack FJ. *Chem Biol.* 2004 Dec;11(12):1619-23.
- Vider BZ, Zimmer A, Chastre E, Gespach C, Halperin M, Mashiah P, Yaniv A, Gazit A. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Jun 7;272(2):513-8.
- Vishwanatha JK, Salazar E, Gopalakrishnan VK. *BMC Cancer.* 2004 Mar 8;4:8.
- Visone R, Croce CM. *Am J Pathol.* 2009 Apr;174(4):1131-8.
- Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambros S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Feb 14;103(7):2257-61.
- Volkenandt M, Schmid-Wendtner MH, Messer G, Plewig G. Stadieneinteilung des malignen Melanoms. *MANUAL Maligne Melanome*, 16-18.(2000). München, Tumorzentrum München.
- Voorhoeve PM, le Sage C, Schrier M, Gillis AJ, Stoop H, Nagel R, Liu YP, van Duijse J, Drost J, Griekspoor A, Zlotorynski E, Yabuta N, De Vita G, Nojima H, Looijenga LH, Agami R. *Cell.* 2006 Mar 24;124(6):1169-81.
- Wagener C. *Molekulare Onkologie. Entstehung und Progression maligner Tumore. 2. aktualisierte und erweiterte Auflage.*(1999). Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Wai PY, Kuo PC. *Cancer Metastasis Rev.* 2008 Mar;27(1):103-18.
- Wakiyama M, Takimoto K, Ohara O, Yokoyama S. *Genes Dev.* 2007 Aug 1;21(15):1857-62.
- Wallner BP, Mattaliano RJ, Hession C, Cate RL, Tizard R, Sinclair LK, Foeller C, Chow EP, Browning JL, Ramachandran KL, et al. *Nature.* 1986 Mar 6-12;320(6057):77-81.
- Waltregny D, Alami Y, Clausse N, de Leval J, Castronovo V. *Prostate.* 2002 Feb 15;50(3):162-9.
- Wang B, Love TM, Call ME, Doench JG, Novina CD. *Mol Cell.* 2006 May 19;22(4):553-60.
- Wasmeier C, Romao M, Plowright L, Bennett DC, Raposo G, Seabra MC. *J Cell Biol.* 2006 Oct 23;175(2):271-81.
- Wells SE, Hillner PE, Vale RD, Sachs AB. *Mol Cell.* 1998 Jul;2(1):135-40.
- Wickens M, Takayama K. *RNA. Nature.* 1994 Jan 6;367(6458):17-8.
- Wightman B, Ha I, Ruvkun G. *Cell.* 1993 Dec 3;75(5):855-62.
- Wightman B, Bürglin TR, Gatto J, Arasu P, Ruvkun G. *Genes Dev.* 1991 Oct;5(10):1813-24.
- Wodarz A. *Curr Biol.* 2000 Sep 7;10(17):R624-6.
- Woodhouse E, Hersperger E, Shearn A. *Dev Genes Evol.* 1998 Feb;207(8):542-50.
- Woods D, Cherwinski H, Venetsanakos E, Bhat A, Gysin S, Humbert M, Bray PF, Saylor VL, McMahon M. *Mol Cell Biol.* 2001 May;21(9):3192-205.
- Wu L, Fan J, Belasco JG. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Mar 14;103(11):4034-9.

Wu L, Belasco JG. *Mol Cell Biol*. 2005 Nov;25(21):9198-208.

Wu Y, Denhardt DT, Rittling SR. *Br J Cancer*. 2000 Jul;83(2):156-63.

Xu LY, Koo J. *Int J Dermatol*. 2006 Nov;45(11):1275-83.

Xuan JW, Hota C, Shigeyama Y, D'Errico JA, Somerman MJ, Chambers AF. *J Cell Biochem*. 1995 Apr;57(4):680-90.

Xuan JW, Hota C, Chambers AF. *J Cell Biochem*. 1994 Feb;54(2):247-55.

Yamamura H, Yoshikawa H, Tatsuta M, Akedo H, Takahashi K. *Int J Cancer*. 1998 Jun 19;79(3):245-50.

Yamanaka T, Horikoshi Y, Sugiyama Y, Ishiyama C, Suzuki A, Hirose T, Iwamatsu A, Shinohara A, Ohno S. *Curr Biol*. 2003 Apr 29;13(9):734-43.

Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, Calin GA, Liu CG, Croce CM, Harris CC. *Cancer Cell*. 2006 Mar;9(3):189-98.

Yekta S, Shih IH, Bartel DP. *Science*. 2004 Apr 23;304(5670):594-6.

Zeng Y, Cullen BR. *RNA*. 2003 Jan;9(1):112-23.

Zeng Y, Wagner EJ, Cullen BR. *Mol Cell*. 2002 Jun;9(6):1327-33.

Zhang HH, Wang XJ, Li GX, Yang E, Yang NM. *World J Gastroenterol*. 2007 May 28;13(20):2883-8.

Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw MS, Giannakakis A, Liang S, Naylor TL, Barchetti A, Ward MR, Yao G, Medina A, O'Brien-Jenkins A, Katsaros D, Hatzigeorgiou A, Gimotty PA, Weber BL, Coukos G. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jun 13;103(24):9136-41.

Zhao Y, Samal E, Srivastava D. *Nature*. 2005 Jul 14;436(7048):214-20.

Zhou BP, Deng J, Xia W, Xu J, Li YM, Gunduz M, Hung MC. *Nat Cell Biol*. 2004 Oct;6(10):931-40.

Zhou Y, Dai DL, Martinka M, Su M, Zhang Y, Campos EI, Dorocicz I, Tang L, Huntsman D, Nelson C, Ho V, Li G. *J Invest Dermatol*. 2005 May;124(5):1044-52.

Abkürzungsverzeichnis

Nicht gesondert aufgeführt sind die im deutschen Sprachgebrauch üblichen Standardabkürzungen.

A	<i>Adenin</i>
Abb.	<i>Abbildung(en)</i>
Amp	<i>Ampicillin</i>
APS	<i>Ammoniumpersulfat</i>
as	<i>antisense</i>
ATP	<i>Adenosintriphosphat</i>
BCA	<i>Bicinchromsäure</i>
bp	<i>Basenpaare</i>
BSA	<i>bovines Serumalbumin</i>
C	<i>Cytosin</i>
cDNA	<i>copy DNA</i>
ChIP	<i>Chromatinimmunpräzipitation</i>
ddH ₂ O	<i>bidestilliertes Wasser</i>
DMEM	<i>Dulbecco`s modified eagle medium</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure</i>
dNTP	<i>Desoxyriboonukleosidtriphosphat</i>
ECM	<i>Extrazelluläre Matrix</i>
EDTA	<i>Ethylendiamin-N',N',N',N',Tetraacetat</i>
EMT	<i>epitheliale-mesenchymale Transition</i>
ERK	<i>extracellular signal regulated protein kinase</i>
et al.	<i>et alii (lat.: „und andere“)</i>
FKS	<i>Fötales Kälberserum</i>
g	<i>Gramm; Gravitationskraft</i>
G	<i>Guanin</i>
h	<i>Stunden</i>
k	<i>Kilo (10³)</i>
kb	<i>Kilobasen(paare)</i>
kDa	<i>Kilo-Dalton</i>
l	<i>Liter</i>
LB	<i>Luria Bertani</i>
m	<i>Milli (10⁻³)</i>
M	<i>Mol; molar</i>
mA	<i>Milliampere</i>
MAP	<i>mitogen activated protein</i>
min	<i>Minute(n)</i>
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
μ	<i>Mikro (10⁻⁶)</i>

n	<i>Nano (10^{-9})</i>
NHEM	<i>Normale humane epidermale Melanozyten</i>
nm	<i>Nanometer</i>
OD	<i>Optische Dichte</i>
p	<i>Pico (10^{-12})</i>
PAA	<i>Poly-Acrylamid</i>
PAGE	<i>Polyacrylamidgelelektrophorese</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	<i>negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-konzentration</i>
RGD	<i>Arginin-Glycin-Asparaginsäure</i>
RGP	<i>radial growth phase</i>
RIPA	<i>radio-immunoprecipitation assay</i>
RNA	<i>ribonucleic acid; Ribonukleinsäure</i>
RT	<i>Reverse Transkription</i>
RT-PCR	<i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfat; Natriumdodecylsulfat</i>
s	<i>Sekunde(n)</i>
T	<i>Thymin</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'-Tetramethyldiamin</i>
U	<i>Unit; Uracil</i>
Upm	<i>Umdrehungen pro Minute</i>
UV	<i>Ultraviolett</i>
V	<i>Volt</i>
W	<i>Watt</i>
(v/v)	<i>Volumenverhältnis (volume per volume)</i>
(w/v)	<i>Masse pro Volumen (weight per volume)</i>
°C	<i>Grad Celsius</i>

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen Menschen meinen Dank aussprechen, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich **Frau Prof. Dr. Anja-Katrin Boßerhoff** für die Vergabe dieses hochinteressanten Themas, die engagierte Betreuung während der Arbeit und die ständige Diskussionsbereitschaft danken. Danke für die Möglichkeit, in deiner Arbeitsgruppe meine eigene kleine „microRNA-Revolution“ ausleben zu dürfen!

Mein besonderer Dank geht auch an **Prof. Dr. Ernst Tamm**, der freundlicherweise die Betreuung dieser Arbeit an der naturwissenschaftlichen Fakultät III übernommen hat.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei dem Leiter des Instituts für Pathologie, **Prof. Dr. Ferdinand Hofstädter**. Für die Möglichkeit, an seinem Institut zu promovieren, das gute Arbeitsklima und vor allem auch für die unterhaltsamen und motivierenden Ansprachen zu den Weihnachtsfeiern.

Ein sehr großes Dankeschön geht an die gesamte **AG Boßerhoff**, für die angenehme Stimmung innerhalb der Gruppe und die unterhaltsamen Gespräche während der Kaffeepausen. Mein besonderer Dank gilt dabei **Sibylla Lodermeier**, welche die allgemeinen Vorräte für RNA- und Protein-Präparationen immer gut gefüllt hält. Ein sehr herzlicher Dank auch an die Mädels aus Labor 1, vor allem an **Simone Braig** und **Lisa Ellman**, für den unterhaltsamen Arbeitsalltag, der nie langweilig wird (unter anderem, weil es immer irgendwo piepst oder scheppert). Bei **Ann-Kathrin Wenke** möchte ich mich für das Korrekturlesen dieser Arbeit und die Geduld dabei bedanken!

Ebenfalls sehr herzlich möchte ich mich bei der ganzen **Familie Müller** bedanken, allen voran bei meinen Eltern **Helmut** und **Brigitte**, welche mir meine wissenschaftliche Laufbahn überhaupt erst ermöglicht und mich immer rückhaltlos unterstützt haben!

Die letzte Stelle in dieser Danksagung, aber die erste Stelle in meinem Herzen nimmt meine Freundin **Ulrike Mägdefrau** ein. Dir ein riesengroßes Dankeschön für die aufopfernde Unterstützung während des Schreibens dieser Dissertation, für das Versorgen mit Nahrung und Kaffee, und vor allem – für die beste Zeit meines Lebens!

Erklärung

Hiermit erkläre ich, **Daniel W. Müller**, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit (einschließlich Abbildungen), die anderen Ursprungs sind, in jedem Einzelfall mit Angabe des Urhebers als solche kenntlich gemacht habe.

Des weiteren versichere ich, dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat, sowie dass ich mich noch nicht anderweitig um einen Doktorgrad beworben habe bzw. einen solchen bereits besitze.

.....
(Ort, Datum)

.....
(Unterschrift)